

## Production of biological active, recombinant members of NGF/BDNF family of neurotrophic proteins.

Patent Number:  EP0450386, A3, B1

Publication date: 1991-10-09

Inventor(s): BEKTESH SUSAN (US); LILE JACK (US); COLLINS FRANK D (US); KOHNO TADAHIKO (US); MISMER DRZISLAV (US)

Applicant(s): SYNERGEN INC (US)

Requested Patent:  JP6319549

Application Number: EP19910104171 19910318

Priority Number (s): US19900505441 19900406; US19900547750 19900702; US19900594126 19901009

IPC

Classification: A61K37/02; C07K13/00; C12N15/12; C12P21/02

EC Classification: C07K14/475, C07K14/48, C12N15/70, C07K14/50B

Equivalents: AU651339, AU7413091,  CA2038669, DE69131514D, DE69131514T, DK450386T, ES2140379T,  FI108146B,  FI911643, GR3031632T,  IE910827, JP2521851B2, NO308308B, NO911303, NZ237544,  US5235043

Cited Documents: EP0121338; EP0333574; EP0386752; WO9103569; WO9103568

### Abstract

This invention describes processes for producing mature human members of the NGF/BDNF family of neurotrophic proteins that are fully biologically active. In addition, the gene encoding human BDNF and human BDNF are disclosed. A previously-unreported member of the NGF/BDNF family of neurotrophic proteins, NGF-3, has been identified and a portion of the gene encoding for the NGF-3 has been described.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-319549

(43)公開日 平成6年(1994)11月22日

(51)Int.Cl. <sup>*</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/12	ZNA			
A 61 K 37/02	AAM	8314-4C		
C 12 N 15/62				
15/70				
	9050-4B		C 12 N 15/ 00	A
			審査請求 有	請求項の数39 O L (全 37 頁)

(21)出願番号 特願平3-73389

(22)出願日 平成3年(1991)4月6日

(31)優先権主張番号 07/505 441

(32)優先日 1990年4月6日

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 07/547 750

(32)優先日 1990年7月2日

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 07/594 126

(32)優先日 1990年10月9日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 391022430

シナージェン、インコーポレーテッド  
SYNERGEN INCORPORATED

アメリカ合衆国 コロラド州 80301, ボ  
ウルダー, 33番ストリート 1885

(72)発明者 フランク ディー. コリンズ

アメリカ合衆国 コロラド州 80302,  
ボウルダー, ロカスト ブレイス 582

(72)発明者 ジャック ライル

アメリカ合衆国 コロラド州 80308,  
ボウルダー, ピーオーボックス 13791

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に統ぐ

(54)【発明の名称】 NGF/BDNF群の神経栄養性タンパク質の生物学的  
え体の生産

に活性な組み換

(57)【要約】 (修正有)

【目的】アルツハイマー病の治療に有用な成熟NGFを  
安価に生産することの可能な細菌発現系の提供。

【構成】生物学的に完全に活性なNGF/BDNF群の  
成熟ヒト神経栄養性タンパク質を生産するための方法。  
ヒトBDNFおよびヒトNGFをコードする遺伝子。こ  
れまで未報告のNGF/BDNF群の神経栄養性タンパ  
ク質のメンバーであるNGF-3の同定方法およびこれ  
をコードする遺伝子の一部。E. Coliにより発現さ  
れたヒトNGF-3を含有するアルツハイマー病治療用  
の医薬組成物およびその使用法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 図1に示す核酸配列から成るヒト脳由来神経栄養性因子(BDNF)をコードする遺伝子、またはその誘導体もしくは変異体。

【請求項2】 196位のGをAで置き換えた、請求項1記載のヒト脳由来神経栄養性因子(BDNF)をコードする遺伝子。

【請求項3】 668位のGをAで置き換えた、請求項1記載のヒト脳由来神経栄養性因子(BDNF)をコードする遺伝子。

【請求項4】 図1に示すアミノ酸配列から成る成熟ヒト脳由来神経栄養性因子(BDNF)または実質的に相同的のタンパク質。

【請求項5】 アミノ酸66のバリンをメチオニンで置き換えた、請求項4記載の成熟ヒト脳由来神経栄養性因子(BDNF)。

【請求項6】 アミノ酸223のアルギニンをリジンで置き換えた、請求項4記載の成熟ヒト脳由来神経栄養性因子(BDNF)。

【請求項7】 図1に示すアミノ酸配列から成るヒト脳由来神経栄養性因子(BDNF)前駆体または実質的に相同的のタンパク質。

【請求項8】 アミノ酸66のバリンをメチオニンで置き換えた、請求項7記載のヒト脳由来神経栄養性因子(BDNF)前駆体。

【請求項9】 アミノ酸223のアルギニンをリジンで置き換えた、請求項7記載のヒト脳由来神経栄養性因子(BDNF)前駆体。

【請求項10】 細菌細胞発現系においてヒト神経栄養性タンパク質の生物学的に活性な成熟体を生産する方法であって：前記タンパク質をコードする遺伝子をベクターに挿入し；前記遺伝子を発現させて生物学的に不活性な形の前記タンパク質を生産させ；そして前記の生物学的に不活性な形態を再生・復元させる；ことを含んで成る方法。

【請求項11】 前記細菌細胞がエシェリヒア・コリ(E. coli)の株である、請求項10記載の方法。

【請求項12】 前記ヒト神経栄養性タンパク質がNGFである、請求項10記載の方法。

【請求項13】 前記ヒト神経栄養性タンパク質がBDNFである、請求項10記載の方法。

【請求項14】 前記ヒト神経栄養性タンパク質がNGF-3である、請求項10記載の方法。

【請求項15】 図6に示す核酸配列から成るヒト成熟NGF-3をコードする遺伝子、またはその誘導体もしくは変異体。

【請求項16】 図7に示すアミノ酸配列から成るヒト成熟NGF-3または実質的に相同的のタンパク質。

【請求項17】 図7に示すアミノ酸配列から成るヒトNGF-3前駆体または実質的に相同的のタンパク質。

【請求項18】 神経栄養性タンパク質を再生・復元させて、前記タンパク質が実質的に完全な生物学的活性を得る方法であって：前記神経栄養性タンパク質に種々の三次元コンホメーションおよび分子内ジスルフィド結合パターンをとらせる反応媒体を生成させ、ここで実質的に全ての前記タンパク質はエネルギー的に最も安定した形をとることとなり；そして前記反応媒体から前記神経栄養性タンパク質を単離する；ことを含んで成る方法。

10 【請求項19】 前記反応媒体が次の工程：前記神経栄養性タンパク質の溶液中で全ての分子内および分子間ジスルフィド結合を破壊して、遊離チオールを形成させ；前記遊離チオールをジスルフィド含有化合物で酸化して混合ジスルフィド結合を形成させ；そしてチオール含有化合物の存在下に前記溶液を希釈する；ことにより生成される、請求項18記載の神経栄養性タンパク質を再生・復元する方法。

【請求項20】 前記反応媒体が嫌気的条件下に維持される、請求項19記載の神経栄養性タンパク質を再生・復元する方法。

20 【請求項21】 前記反応媒体がグリコール含有試薬を含有する、請求項19記載の神経栄養性タンパク質を再生・復元する方法。

【請求項22】 前記グリコール含有試薬がポリエチレングリコールである、請求項21記載の神経栄養性タンパク質を再生・復元する方法。

【請求項23】 前記破壊が前記溶液に変性剤および還元剤を加えることにより達成される、請求項19記載の神経栄養性タンパク質を再生・復元する方法。

30 【請求項24】 前記変性剤がグアニジン塩酸塩または尿素である、請求項23記載の神経栄養性タンパク質を再生・復元する方法。

【請求項25】 前記ジスルフィド含有化合物が酸化型のグルタチオン、シスチンまたはシスタミンである、請求項19記載の神経栄養性タンパク質を再生・復元する方法。

【請求項26】 前記チオール含有化合物がシステインまたはジチオトレイトールである、請求項19記載の神経栄養性タンパク質を再生・復元する方法。

40 【請求項27】 請求項12の方法により製造された生物学的に活性なNGFを、許容しうる製剤上の担体中に含有する医薬組成物。

【請求項28】 生物学的に活性なヒトBDNFを、許容しうる製剤上の担体中に含有する医薬組成物。

【請求項29】 前記BDNFが請求項13の方法により製造される、請求項28記載の医薬組成物。

【請求項30】 生物学的に活性なヒトNGF-3を、許容しうる製剤上の担体中に含有する医薬組成物。

【請求項31】 前記NGF-3が請求項14の方法により製造される、請求項30記載の医薬組成物。

50 【請求項32】 E.コリ内で組み換えにより発現されたヒ

ト成熟NGFを折りたたみ、その際前記タンパク質は生物学的活性を獲得する方法であって：E.コリにより発現された前記NGFを、8モル尿素含有20mMクエン酸ナトリウム、約pH3.0、中に約0.6mg/mlの濃度まで溶解させ；8モル尿素含有1Mトリス溶液、約pH8.5、を加えて前記溶液のpHを上げ；約5-15mMの濃度までジチオトレイトルを加えて前記NGFを還元し；約15-50mMの濃度まで酸化型のグルタチオンまたはシスチンを加えて前記NGFを酸化し；約3.2-4.2M尿素含有100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、約pH8.0、の溶液を用いてNGFの前記溶液を約9倍に希釈し；グルタチオンまたはシスチンの濃度に対して約2-3倍のシスティンを加えて前記NGFのジスルフィド相互交換を触媒させ；そして前記反応混合物から前記NGFを単離する；ことを含んで成る方法。

【請求項33】 細菌発現系内で組み換えにより発現されたヒト成熟NGFを折りたたみ、その際前記タンパク質は生物学的活性を獲得する方法であって：細菌により発現された前記NGFを含有する溶液にジチオトレイトルまたはβ-メルカプトエタノールを加え；前記溶液に酸化型グルタチオンまたはシスタミンを加え；グリコール含有試薬を含有する緩衝溶液を用いて前記溶液を希釈し；システィンまたは2-メルカプトエチルアミンを加えて最終再生混合物を生成させ；前記最終再生混合物を脱気し；そして前記最終再生混合物から前記NGFを単離する；ことを含んで成る方法。

【請求項34】 神経学的疾患を治療するための生物学的に活性なヒトBDNFを含有する医薬組成物の使用法。

【請求項35】 アルツハイマー病を治療するための生物学的に活性なヒトBDNFを含有する医薬組成物の使用法。

【請求項36】 神経学的疾患を治療するための生物学的に活性なヒトNGF-3を含有する医薬組成物の使用法。

【請求項37】 アルツハイマー病を治療するための生物学的に活性なヒトNGF-3を含有する医薬組成物の使用法。

【請求項38】 神経学的疾患を治療するための生物学的に活性な、細菌により発現されたヒトNGFを含有する医薬組成物の使用法。

【請求項39】 アルツハイマー病を治療するための生物学的に活性な、細菌により発現されたヒトNGFを含有する医薬組成物の使用法。

#### 【発明の詳細な説明】

【0001】 【発明の分野】 本発明は、生物学的に活性な形をした、ヒトNGF/BDNF群の神経栄養性タンパク質の組み換え体の生産方法に関する。さらに、本発明は、この群のタンパク質のこれまで報告されていないメンバーを同定し、かつ統いてこれらのタンパク質を生産する方法について開示する。

【発明の背景】 神経栄養性因子（neurotrophic factor）は神経系または神経系によって刺激された非神経組織に存在する天然タンパク質であり、その機能は神経細胞および/またはグリア細胞の生存を促進し、それらの表現型分化を維持することである（Varon and Bunge 1978 *Ann. Rev. Neuroscience* 1:327; Thoenen and Edgar 1985 *Science* 229:238）。この生理学的役割ゆえに、神経栄養性因子はアルツハイマー病やバーキンソン病のような種々の神経変性性疾患に、あるいは脳卒中や脊髄への物理的外傷のような外傷性障害後に起こる神経細胞の変性および分化機能の低下を治療するのに有用であろう（Appel 1981 *Ann. Neurology* 10:499）。

【0002】 特定の神経栄養性因子が神経損傷の治療に有用でありうるためには、そのクラスの損傷を受けた神経細胞がその因子に反応しなければならない。一般に、異なる神経栄養性因子は異なるクラスの神経細胞に別々に影響を及ぼす。従って、様々な形態の病気または傷害に現れる各クラスの損傷ニューロンを治療するためには、種々の異なる神経栄養性因子を手中にすることが得策である。

【0003】 所定の神経栄養性因子は、正確なニューロン特異性をもつことのほかに、薬物治療に使用するに足る量で入手できなければならない。さらに、神経栄養性因子はタンパク質であるので、外来タンパク質に対する免疫応答を避けるために、ヒト形態のタンパク質のみをヒト患者に投与することが望ましいだろう。神経栄養性因子は一般に組織中に微量で存在し（例えば、Hofer and Barde 1988 *Nature* 331:261; Linら 1989 *Science* 246:1023）、しかもヒト組織は抽出のために簡単に入手できないので、製剤量のヒト神経栄養性因子をヒト組織から直接製造することは不都合であろう。代わるべき手段として、神経栄養性因子のヒト遺伝子を単離し、その遺伝子を無限量のヒトタンパク質を生産しうる組み換え発現系を確立するための土台として使用することが望ましいであろう。

【0004】 アミノ酸配列において密接な関係があるが、異なる（一部重複するが）組の応答性ニューロンに影響を及ぼす2種類の神経栄養性因子は記載されている（Leibrockら 1989 *Nature* 341:149）。これらの2種類の神経栄養性因子は：（1）神経成長因子（NGF）および（2）脳由来神経栄養性因子（BDNF）である。明らかに、NGFとBDNFは両方とも比較的大きい前駆体として合成され、その後これらの前駆体はタンパク質分解的切断によるプロセッシングを受けて成熟神経栄養性因子を生ずる（Edwards et al, 1986 *Nature* 319:784; Leibrockら 1989 同上）。これまでに報告されたNGF/BDNF群の神経栄養性因子のメンバーの遺伝子は、NGFの場合がヒトと種々の動物遺伝子であり（Scottら 1983 *Nature* 302:538; Ulrichら 1983 *Nature* 303:821; Meierら 1986 *EMBO J.* 5:1489）、そしてB

D N F の場合がブタ遺伝子であるにすぎない (Leibrock ら 1989 同上)。成熟 N G F と成熟 B D N F との間にはアミノ酸配列に有意な類似性があり、例えば 6 個すべてのシステインアミノ酸残基の相対位置は試験した全部の種からの成熟 N G F や B D N F において一致している (Leibrock ら 1989 同上)。ヒト形態の N G F と B D N F を比較して、その類似性を強調する図 7 を参照されたい。これは、ジスルフィド結合の位置から決定して、これら 2 種類のタンパク質の三次元構造が類似していることを示唆している。両方の成熟タンパク質はまた塩基性等電点 (p I) を共有する。

【0005】N G F は少なくとも基底前脳のコリン作動性ニューロンにとっての神経栄養性因子である (Hefti および Will 1987 *J. Neural Transm. Suppl. (AUSTRIA)* 24:309)。アルツハイマー病の進行中に起きる、N G F 応答性の基底前脳コリン作動性ニューロンの機能的不活性化および変性はこの病気と関連した認識・記憶欠損の主因であると考えられる (Hefti および Will 1987 同上)。N G F はアルツハイマー病に関係した動物モデルにおいて基底前脳コリン作動性ニューロンの変性を阻止してその機能を回復させることができ、これに基づいてアルツハイマー病におけるこれらのニューロンの変性を阻止してその機能を回復させるための治療薬として提案されている (Williams ら 1986 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9231; Hefti 1986 *J. Neuroscience* 6:2155; Kramer 1987 *Science* 235:214; Fischer ら 1987 *Nature* 329:65)。

【0006】B D N F は末梢神経系の知覚ニューロンのための神経栄養性因子である (Barde 1989 *Neuron* 2:15 25)。これに基づけば、B D N F はいろいろな末梢神経障害に現れる知覚神経細胞の損傷と関連した感覚喪失の治療に有用であることが分かるであろう (Schaumberg ら 1983 "Disorders of Peripheral Nerves" F.A. Davis Co., Philadelphia, PA.)。

【0007】医薬開発に必要とされる、完全に生物学的に活性で、構造的に修飾されていない成熟 N G F を大量に生産しうる組み換え発現系は非常に望ましい。昆虫細胞における N G F の組み換え発現を記載している、欧州特許公開第 E P 8 9 1 1 3 7 0 9 号を参照されたい。生物学的に活性な成熟 N G F は、ヒトまたは動物 N G F 遺伝子が真核細胞発現系により発現される場合に生産できる (例えば、Edwards ら 1988 *Molec. Cell. Biol.* 8:24 56)。かかる系では、初めて全長 N G F 前駆体が合成され、その後タンパク質分解によるプロセッシングを受けて、三次元的に正しく折りたたまれ、完全に生物学的に活性な成熟 N G F を生成する。しかしながら、真核細胞発現系はしばしば細胞のグラム当たりのタンパク質収量が比較的低く、製造に使用するには割合経費がかさむ。

【0008】対照的に、細菌のような原核細胞を使う発

現系では一般に細胞のグラム当たりの発現タンパク質の量が比較的多く、製造に使用するのに割合費用がかからない。しかしながら、完全に生物学的に活性で、構造的に修飾されていない成熟 N G F を生産しうる適切な細菌発現系は記載されていない。カナダ国特許第 1 2 2 0 7 3 6 号に細菌発現系が開示されている。しかし、発現されたタンパク質を再生 (refolding) する方法は何も提示されていない。この失敗はたぶん一般的に細菌発現系と関係した問題、並びに細菌内で N G F を生産させるために使用した特定の技法と関係した問題にまでさかのぼることができよう。

【0009】細菌は、より小さい正しい成熟タンパク質を生成させるために、適切なタンパク分解的フラグメントを行って N G F 前駆体タンパク質のような前駆体タンパク質を正しくプロセッシングすることができない。それ故に、細菌に成熟 N G F を生産させるためには、より大きい前駆体形ではなく、成熟タンパク質をコードする N G F DNA 配列の部分だけを発現させることが必要である。これをエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) で行った場合は、比較的大量の成熟ヒト N G F タンパク質が生産された (例えば、Iwai ら 1986 *Chem. Pharm. Bull.* 34:4724; Dicou ら 1989 *J. Neurosci. Res.* 22:13; E P 出願第 1 2 1 3 3 8 号を参照されたい)。不運にも、細菌により発現されたタンパク質は生物学的活性がほとんどないか、あるいは全くなかった。

【0010】細菌発現 N G F を再生するプロトコルは欧州特許出願第 3 3 6 3 2 4 号に記載されており、ここでは細菌内で生産された成熟 N G F に若干の生物学的活性を回復させている。しかしながら、このプロトコルは重大な欠点をもっている。成熟ヒト N G F は、多くの真核細胞発現系が高価であり、しばしば十分量の成熟 N G F を生産しないので、一般に医薬用途に充分な量で得ることができない。これまでに開示された細菌発現系は、生物学的に活性で化学的に修飾されていない成熟 N G F を医薬用途に充分な量で生産していない。ヒト成熟 N G F はアルツハイマー病の治療に有用であると思われるのと、科学界および臨床医学界はこの物質が自由に入手できないことを痛切に感じている。生物学的に活性なヒト成熟 N G F が入手できないことは、アルツハイマー病治療薬としての N G F の今後の開発における臨床的障害であるとして、the National Institute on Aging (国立老化研究所) が集めた、一流の科学者達のグループによって指摘された (Phelps ら 1989 *Science* 243:11)。

【0011】同様の製造上の困難が N G F / B D N F 群の神経栄養性タンパク質のそれぞれの構成タンパク質にもあてはまると考えられる。なぜならば、これまでに記載されたこの群のタンパク質はシステインアミノ酸残基を同じ位置に配置して有しており、従って恐らく N G F と同じ分子内ジスルフィド結合のパターンを形成すると考えられるからである (Angelletti ら 1973 *Biochemist*

□ 12:100)。

【0012】かかる神経栄養性タンパク質の明白な価値並びに上記のような大量の生物学的活性タンパク質の生産に対する目下の制限を考慮すると、次のことを提供することが望ましいであろう：(1) NGF／BDNF群の神経栄養性タンパク質のすべての構成タンパク質、すなわちこれら2種類のタンパク質が互いに関係があるとされた方法と類似した方法でNGFおよびBDNFに構造的に関係があるタンパク質の同定、単離および特性決定；(2) NGF／BDNF群の神経栄養性タンパク質の天然に存在するすべてのヒトタンパク質（特にヒトBDNFを含む）の同定、単離および特性決定；(3) NGF／BDNF群の神経栄養性タンパク質の任意のすべてのタンパク質をコードする遺伝子（特にかかる群のすべてのタンパク質をコードするヒト遺伝子）の単離および特性決定；(4) これらのヒトタンパク質の成熟（プロセッシングを受けた）形態を多量に生産する、E.coliのような微生物中に組み換え発現系を確立するためのヒト遺伝子の使用方法；(5) 生物学的特異活性を獲得させるためにNGF／BDNF群の神経栄養性タンパク質のタンパク質を再生する方法；および(6) NGF／BDNF群の神経栄養性タンパク質のいずれか1種またはこれらのタンパク質の任意の組合せからなる神経学的疾患を治療するための医薬組成物。

【発明の要約】本発明は、NGF／BDNF群の神経栄養性タンパク質の生物学的に活性なメンバーの生産方法、ヒトBDNFをコードする遺伝子の核酸配列およびヒトBDNFの推定アミノ酸配列、並びにこの群の神経栄養性タンパク質の以前に報告されていないメンバー（NGF-3を含む）をコードする遺伝子の核酸配列およびかかるタンパク質の推定アミノ酸配列に関する。

【0013】効率のよい細菌発現系、特にE.coliにおけるNGF／BDNF群の神経栄養性タンパク質の発現方法を記載する。さらに、細菌により生産された生物学的に不活性な成熟ヒト神経栄養性タンパク質に生物学的活性を回復させる方法が記載される。より詳細には、NGFの発現方法および生物学的に活性な形をしたヒト成熟NGFの効果的な再生が記載される。ここでNGF-3と呼ばれる、NGF／BDNF群の神経栄養性タンパク質の以前には報告されていないメンバーが同定され、NGF-3をコードするヒト遺伝子の核酸配列が同定され、そしてNGF-3の推定アミノ酸配列が記載される。

【0014】また、本発明は、いろいろな神経変性性疾患に現れる神経細胞の変性および分化機能の低下を治療するための医薬製剤として価値あるNGF／BDNF群の神経栄養性タンパク質のすべてのメンバーの精製形の生産をも包含する。本出願は、実質的に図1に示される核酸配列から成るヒト脳由来神経栄養性因子（BDNF）をコードする遺伝子、並びに196位および／また

は668位のGをAで置き換えたこの配列を記載し、特許請求している。さらに、実質的に図1に示されるアミノ酸配列から成る成熟ヒト脳由来神経栄養性因子（BDNF）、並びにアミノ酸66のバリンをメチオニンで置き換えそして／またはアミノ酸223のアルギニンをリジンで置き換えたこの配列も記載する。ヒト成熟NGF-3は図7に示されるアミノ酸配列から成り、ヒト成熟NGF-3をコードする遺伝子は図6に示される核酸配列から成っていた。

10 【0015】神経栄養性タンパク質を再生・復元する（その際、タンパク質は実質的に完全な生物学的活性を獲得する）方法は、前記神経栄養性タンパク質にいろいろな三次元コンホーメーションおよび分子内ジスルフィド結合パターンをとらせる（反応媒体を生成させ、ここで実質的にすべての前記タンパク質はエネルギー的に最も安定した形をとるであろう）；そして前記反応媒体から前記神経栄養性タンパク質を単離することから成っている。

【0016】ヒト神経栄養性タンパク質の生物学的に活性な成熟形を生産するための細菌細胞発現系は：前記タンパク質をコードする遺伝子をベクターに挿入し；前記遺伝子を発現させて前記タンパク質の生物学的に不活性な形態を形成させ；そして前記の生物学的に不活性な形態を再生・復元することを含んで成る。ヒトの神経学的疾患を治療するための医薬組成物は、許容しうる製剤上の担体中に生物学的に活性なヒトNGF-3、ヒトBDNFおよび／またはヒトNGFを含有する。

【0017】上記の一般的記載および以下の詳細な記載は単なる例示および説明であって、特許請求した本発明を制限するものでないことを理解すべきである。本明細書に組み込まれてその一部を構成する添付図面は本発明のいろいろな実施態様を例示し、そして詳細な説明と合わせて本発明の原理を理解する上で役立つであろう。

【図面の簡単な説明】図1は、ヒトBDNFの核酸および推定アミノ酸配列を示す。成熟（プロセッシングを受けた）形BDNFの推定アミノ酸配列は太字で示してある。

【0018】図2は、ベクターpT5Tを用いたE.coliにおけるヒト成熟（プロセッシングを受けた）NGFの発現を示す。詳細は実施例2で説明する。図3は、真核細胞により生産された成熟ヒトNGFの変性および再生の際の、それぞれの生物学的活性の低下および回復を示す。図4は、細菌発現ベクターpT5Tのいくつかの特徴を示す。特徴は描寫したにすぎず、正確な比率で描いたものではない。NGF挿入物はNGF／BDNF群の神経栄養性タンパク質の任意のメンバーを示す。

【0019】図5は、細菌発現ベクターpT3X1-2のいくつかの特徴を示す。特徴は描寫したにすぎず、正確な比率で描いたものではない。NGF挿入物はNGF／BDNF群の神経栄養性タンパク質の任意のメンバー

を示す。図6は、NGF-3の核酸配列とNGFおよびBDNFの配列との比較である。点線で示したギャップはアミノ酸配列を整合させるために用いたギャップの位置に相当する（図7を参照）。PCRにより得られたNGF-3の部分核酸配列には下線が引いてある。

【0020】図7は、NGF-3のアミノ酸配列とNGFおよびBDNFの配列との比較である。成熟タンパク質の推定配列は太字で示してある。BDNFまたはNGFの成熟配列において下線が引いてある各アミノ酸はNGF-3の対応アミノ酸と同一である。NGF-3の成熟配列において下線が引いてある各アミノ酸はNGFとBDNFの両方の対応アミノ酸と同一である。点線で示したギャップは整合を高めるために配列中に置かれた。BDNF、NGFおよびNGF-3に存在する6個のシステインは3種類すべてのタンパク質で同じ位置にあり、かっこでくくってある。

【0021】図8は、ヒトBDNF挿入物を含むかまたは含まないプラスミドpSG5でトランスフェクトされたCOS-7細胞の抽出物の、E10ニワトリ背根神経節ニューロンを使ったバイオアッセイを示す。図9は、E11ニワトリ胚交感神経節ニューロンに対するバイオアッセイを用いた。昆虫細胞により生産されたヒト組み換えNGFの用量-応答曲線を示す。

【0022】図10は、E11ニワトリ胚交感神経節ニューロンに対するバイオアッセイを用いた。E.coliにより生産されたヒト組み換えNGFの最終再生混合物の連続希釈物の生物学的活性を示す。図11は、(A) 100ngの天然の、昆虫細胞により生産されたNGFを加えた図10でアッセイした最終再生混合物50μl；および(B)天然の、昆虫細胞により生産されたNGFを加えなかった最終再生混合物50μl；の逆相高性能液体クロマトグラフィーによる分析を示す。天然の、昆虫細胞により生産されたNGFが普通にこのカラムを流れる位置は符号NGFと矢印で示してある。

【0023】図12は、精製前の最終再生混合物を逆相HPLCによりC4カラムでクロマトグラフィーにかけた場合のタンパク質の溶離プロフィール(214nmでの光学濃度)を示す。適切に再生されたNGFは約37%のアセトニトリルで溶離する最大タンパク質ピークである。図13は、透析および濃縮後であるがS-セファロース前の最終再生混合物を逆相HPLCによりC4カラムでクロマトグラフィーにかけた場合のタンパク質の溶離プロフィール(214nmでの光学濃度)を示す。適切に再生されたNGFは約37%のアセトニトリルで溶離する最大タンパク質ピークである。

【0024】図14は、S-セファロースで精製後の最終再生混合物を逆相HPLCによりC4カラムでクロマトグラフィーにかけた場合のタンパク質の溶離プロフィール(214nmでの光学濃度)を示す。適切に再生されたNGFは約37%のアセトニトリルで溶離する最大

タンパク質ピークである。主ピークの直後に溶離する小さいタンパク質ピークは、逆相HPLCによるクロマトグラフィー中に形成された適正に再生されたNGFの単量体である。

【好適な実施態様の説明】本発明の原理を理解する上で、以下の実施例と合わせて、役に立つ本発明の目下の好適な実施態様を詳細に説明する。

【0025】本発明は、ある“群(family)”の神経栄養性タンパク質の同定および生産を多面的に記載する。

10 NGFおよびBDNFは、おそらく生物におけるそれらの生理学的役割を異にする（すなわち、各メンバーは異なる組の応答性ニューロンに影響を及ぼす）構造的に関連した神経栄養性タンパク質の一群を規定すると思われる。神経系に対する種々の形態の損傷によりその機能を損なわれた異なる神経細胞型を治療するのに利用できる1そろいの神経栄養性タンパク質を得るために、このNGF/BDNF群の任意のそしてすべての付加的なメンバーの遺伝子を単離することが大いに望まれるであろう。

20 【0026】ヒトを治療するにはヒトタンパク質を使用することが望ましい。この原理によれば、ヒトタンパク質を製造するにはBDNFのヒト遺伝子を得ることが望ましいであろう。また、この原理、およびいろいろな神経学的症状を治療するためには異なるニューロン特異性を備えた1そろいの神経栄養性タンパク質を有することが望ましいという上記原理によれば、NGF/BDNF群の神経栄養性タンパク質の任意のそしてすべての付加的なメンバーのヒト遺伝子を得ることが望ましいであろう。

30 【0027】生物学的に活性な細菌発現NGFが得られないということはこの分野における大きな障害である。この生物学的活性が欠如する理由は、成熟NGFタンパク質が自然に正しい三次元構造をとりかつ正しい分子内ジスルフィド結合を形成する（両方とも生物学的活性に必要不可欠である）ことができないということらしい。従って、完全な生物学的活性に必要とされる三次元構造と分子内ジスルフィド結合パターンを細菌発現成熟NGFに回復させることができる再生プロトコルを開発することが必要であろう。

40 【0028】欧州特許出願第336324号に記載されたNGFの再生プロトコルは十分にこの問題を解決していない。このプロトコルは高pHにさらし(pH13が推薦される)——細菌により生産されたNGFの正しくないジスルフィド結合を破壊すると思われる——その後pHを低下させるものである——正しい分子内ジスルフィド結合形成の機会を与えると思われる。このプロトコルで採用している高pHへの暴露は、グルタミンおよびアスパラギン（成熟ヒトNGF中に7個存在する）のアミン側鎖の排除並びにアスパラギンーグリシン、アスパラギンーセリンおよびアスパラギンートレオニン隣接対

(成熟ヒトNGF中に2個存在する)の広範な化学的変化を含む、タンパク質の広範な修飾を引き起こすことが知られている。これらの化学的修飾のほかに、この再生法はNGFの生物学的活性の約1/10を回復させないことが明らかになった。従って、欧州特許出願第336324号に記載されたプロトコルは、完全に生物学的に活性で、化学的に修飾されていない成熟ヒトNGFを得るには不十分であることが明らかである。苛酷な条件を使用しないタンパク質の再生・復元プロトコルは数多く存在するが、かかる方法はどれもNGFにうまく当てはまらなかった。再生法の一般的な記載については、H. Kohno, *Methods Enzymol.*, vol. 185, p. \_\_\_\_\_ (1990) を参照されたい。

【0029】これらの考察に基づくと、完全に生物学的に活性で、化学的に修飾されていない成熟ヒトNGFを細菌中に大量に生産できる製造システムは、医薬用途に適した生物学的に活性で修飾されていない形におけるNGF/BDNF群の任意のタンパク質を同様に大量に生産せしるのに有用であろう。

#### 1. ヒトBDNFの単離

本発明の一実施態様では、BDNFの前駆体および成熟体をコードするヒト遺伝子を得るための方法が提供される。本発明はヒトBDNFの前駆体および成熟体、並びにかかるタンパク質をコードする遺伝子を含む。本明細書全体を通して、神経栄養性タンパク質の成熟体はタンパク分解的フラグメント後に自然界に存在するような生物学的に活性な形のタンパク質を意味する。神経栄養性タンパク質の前駆体はタンパク分解的フラグメント前のヒト遺伝子によりコードされるタンパク質を意味する。以下の実施例1で説明する、この実施態様の好適な形式では、ブタBDNFをコードする核酸配列の種々の領域に基づいて、鎖長約15-30塩基の合成オリゴヌクレオチドBDNF-1、BDNF-2、BDNF-2A、BDNF-2B、BDNF-3、BDNF-4およびBDNF-5が作製された。これらのブタBDNFオリゴヌクレオチドは、ヒトBDNF遺伝子の介在セグメントを増幅させるために、錫型としてヒトゲノムDNAを用いるポリメラーゼ・チェイン・リアクション(PCR)においてプライマーとしていろいろな組合せで使用される。増幅されたフラグメントをサブクローニングし、サブクローンはPCRで用いた2つのプライマー間に存在する配列を表す別のオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズするものについてスクリーニングされる。

【0030】このスクリーニングで単離した陽性サブクローンは、BDNF遺伝子の部分としてのそれらとの同一性を確認するために配列決定できる。1以上のこれらの増幅フラグメントを使って、BDNFのヒト遺伝子を得るためにヒトゲノムDNAライブラリーをスクリーニングできる。ヒトゲノムクローンのサブクローン化制限

フラグメントは、ヒトBDNFの前駆体および成熟体をコードする核酸配列および推定アミノ酸配列を得るために配列決定される。これらの方法により得られた、本発明の範囲に含まれるヒトBDNFの核酸配列および推定アミノ酸配列を図1に示す。

#### 【0031】2. NGF/BDNF群の神経栄養性タンパク質の以前に報告されていないメンバーの同定

本発明の一実施態様では、NGF/BDNF群の神経栄養性タンパク質の以前に報告されていない新メンバーの

10 前駆体および成熟体をコードするヒト遺伝子を得るための方法が提供される。所望のヒトDNA配列は、ヒトNGFまたはBDNFと同一でないが、この群のありうる限定性特徴に関してNGFまたはBDNFと明らかに関係があるタンパク質をコードする未報告の任意のすべての配列である。かかる特徴には1以上の次のとくすなわち、適当なバイオアッセイでの神経栄養性活性；アミノ酸の同一性および保存的置換の両方を含むアミノ酸配列における有意な相同性；アミノ酸配列中のシステイン残基の保存された位置；タンパク質分泌のための疎水性

20 シグナル配列；成熟体へのタンパク分解的プロセッシングのためのシグナル配列；および/またはプロセッシングを受けたタンパク質の塩基性等電点；が含まれる。

【0032】A. この実施態様の好適な一形式では、鎖長約15-40塩基の数種類の合成

オリゴヌクレオチドが動物およびヒトNGFおよびBDNFをコードする核酸配列の保存および可変領域に基づいて作製される。これらのNGF/BDNFオリゴヌクレオチドは、NGF/BDNF群のメンバーのヒト遺伝子の介在セグメントを増幅させるために、錫型としてヒトゲノムDNAまたは神経系の種々の別々の領域から作製したヒトcDNAライブラリーを用いるPCRにおいてプライマーとしていろいろな組合せで使用できる。

【0033】神経系の別々の領域からのcDNAを用いることは、(1) NGFおよびBDNFに関するメッセージを多量に含まない領域がNGFおよびBDNFそれら自体からPCRにより増幅されたフラグメントのバックグラウンドを減ずることができる；および(2) 所望のニューロン集団に影響を及ぼす神経栄養性因子が神経系の予測しうる領域に存在すると思われる；ので有利である。

【0034】増幅されたフラグメントをサブクローニングし、個々のサブクローンは(a)オリゴヌクレオチドプライマー間に存在するDNA配列を表す縮重オリゴヌクレオチドとのポジティブハイブリダイゼーションによるか、あるいは(b) NGFまたはBDNFから増幅されるとほぼ予想される大きさの挿入物を含有するサブクローンを検出するための制限マッピングにより選択できる。

【0035】かかる選択されたサブクローンは、それらがNGF/BDNF群のNGF、BDNFまたは新メン

バーの遺伝子部分であるかどうか調べるために配列決定できる。サブクローン化され増幅されたフラグメントが NGF / BDNF 群の新メンバーであると思われる場合は、このフラグメントを放射性標識して、推定上の新しい神経栄養性タンパク質のヒト遺伝子を得るためにヒトゲノム DNA ライブライマーのスクリーニングに使用できる。このヒト遺伝子は新しい神経栄養性タンパク質の前駆体および成熟体をコードする核酸配列および推定アミノ酸配列を得るために配列決定できる。

【0036】B. この実施態様の2番目の好適な形式では、上記のようにPCRで増幅されたフラグメントのサブクローンを、NGFまたはBDNF遺伝子に特有の非縮重断片を数種類のそれぞれを用いてスクリーニングできる。このスクリーニングの目的は、すでに特性決定されたNGFおよびBDNFメンバーから増幅された断片を排除することにより、NGF / BDNF 群の新タンパク質の遺伝子から増幅された断片の単離を容易にすることである。この方法でNGFおよびBDNFと異なると同定された増幅断片は配列決定してそれらの同一性を確認でき、そして適当な場合には、上記のようにヒト遺伝子を得るために使用できる。

【0037】C. この実施態様の3番目の好適な形式では、ヒトゲノムライブライマーおよび神経系の種々の別々の領域から作製されたヒト cDNA ライブライマーをスクリーニングして、NGF / BDNF 群のありうる新しいメンバーを含有するクローナーをつきとめることができ。かかるライブライマーはNGFまたはBDNFをコードするヒトDNA配列の一部を使って、あるいは動物およびヒトNGFまたはBDNFをコードする核酸配列の種々の保存および可変領域に基づいて作製された、鎖長約15-40塩基の合成オリゴヌクレオチドの1つを使ってスクリーニングできる。これらのライブライマーのスクリーニングにおいてハイブリダイゼーションの緊縮性(stringency)を低下させると、プローブはNGFおよびBDNF配列を含有するクローナーとハイブリダイズするばかりでなく、類似の(たぶん関係がある)配列ともハイブリダイズできる。NGFおよびBDNFのメッセージを多量に含まない神経系の領域からのcDNAライブライマーをスクリーニングすることは、NGFおよびBDNFクローナーのバックグラウンドを減らすのに得策であろう。これらのスクリーニングで同定されたクローナーは、それらがNGF / BDNF 群の新しいメンバーの遺伝子であるかどうか判定するために配列決定できるし、あるいはすでに知られたNGFおよびBDNFの遺伝子である可能性があるものを排除するために、それらは先行する節で述べたようにさらにスクリーニングすることができる。

【0038】この実施態様の3つの好適な形式はそれぞれNGF / BDNF 群の神経栄養性タンパク質の新しいヒトタンパク質の前駆体および成熟体をコードする核酸

配列および推定アミノ酸配列を得るのに使用できる。本発明はNGF / BDNF 群の神経栄養性タンパク質の以前に報告されたことのない任意のすべてのタンパク質を包含するものである。

【0039】NGF / BDNF 群の神経栄養性タンパク質の新しいメンバーが上記方法を使って同定されている。以下の実施例4で説明するように、また図6に示すように、以前に報告されたことのないタンパク質NGF-3をコードする完全な核酸配列が同定された。図6に示した核酸配列に基づいて、成熟および前駆体NGF-3の完全な推定アミノ酸配列が得られた。配列決定されたNGF-3遺伝子を参考にして推定された、NGF-3のアミノ酸配列を図7に示す。

【0040】さらに、本発明はここに記載した神経栄養性タンパク質と生物学的に均等な任意の起源の神経栄養性タンパク質を包含する。好適な実施態様においては、本発明は成熟ヒト神経栄養性タンパク質を包含する。本明細書全体を通して、神経栄養性タンパク質への言及はNGF / BDNF 群の神経栄養性タンパク質のメンバーとして同定され、ここに記載されたタンパク質のことを指すと解釈されるべきである。

【0041】本明細書および請求の範囲で用いる“生物学的に均等”とは、神経細胞またはグリア細胞の生存を促進しつつそれらの表現型分化を維持する能力をもつ(しかし、必ずしもここに記載した天然の神経栄養性タンパク質と同程度である必要はない)本発明物質を意味する。本明細書および請求の範囲で用いる“実質的に相同”とは、以前に報告された任意の神経栄養性タンパク質が示す相同度を越えた天然神経栄養性タンパク質との相同度を意味する。好ましくは、相同度は70%以上、より好ましくは80%以上、最も好ましくは90%、95%または99%以上である。特に好適なグループの神経栄養性タンパク質は天然タンパク質と95%以上相同である。ここに記載した相同の百分率は、Dayhoff, *Atlas of Protein Sequence and Structure* Vol. 5, p. 124 (1972), National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C. (参考文献としてここに詳細にとり込まれる)に記載されるように、その整合を助けるために、100アミノ酸の鎖長に4つのギャップを導入し

40 た場合に、比較される配列中の同一のアミノ酸残基と整合する2つの配列の小さい方に存在するアミノ酸残基の百分率として計算される。また、ここに記載したタンパク質に対する抗体との交差反応によって単離できる神経栄養性タンパク質、あるいは記載したタンパク質の遺伝子またはセグメントとのハイブリダイゼーションにより遺伝子を単離しうる神経栄養性タンパク質も実質的に相同なものとして包含される。

【0042】3. 遺伝子発現  
本発明の一実施態様においては、NGF / BDNF 群の神経栄養性タンパク質のメンバーのヒト遺伝子(NG

F. BDNF および NGF-3 のヒト遺伝子を含む) は、各遺伝子によりコードされる成熟ヒト神経栄養性タンパク質を製造するための組み換え発現系を確立するのに使用できる。この実施態様の好適な形式では、発現が微生物、特に *E. coli* 内で行われる。

【0043】 それぞれの神経栄養性タンパク質の遺伝子は *E. coli* 内での効率のよい発現を促進するために修飾できる。かかる修飾 (以下で詳細に説明する) には、制限するものではないが、次のもの: (i) 遺伝子中に存在しうる付加的なコード配列および非コード配列を除去することによる、推定された成熟 (プロセッシングを受けた) 形態のタンパク質だけをコードする DNA 配列の作製; (ii) *E. coli* により優先的に利用されるコドンへのヒトコドンの変更; (iii) *E. coli* における効率のよい翻訳を促進するための翻訳カーブラーの付加; (iv) その後の連結反応およびクローニングに便利な新しい制限部位の挿入; および (v) *E. coli* における DNA の効率のよい発現を促進するよう設計された数種の発現ベクターの 1 種またはそれ以上への DNA の挿入; が含まれる。最終的な発現構築物を適当な *E. coli* 株中に形質転換し、そして成熟神経栄養性タンパク質を生産する形質転換体がスケールアップおよび製造のために選択できる。本発明の好適な実施態様に従った、*E. coli* における NGF の発現を以下の実施例 2 に記載する。

#### 【0044】 A. 総論

かかる神経栄養性タンパク質を直接生産するのに、天然または合成 DNA 配列を使用できる。本発明の一実施態様では、別の形態の神経栄養性因子 (活性部位がここに記載した神経栄養性タンパク質と生物学的に等しい様式で機能する) を生産できる。一般的発現方法は:

1. 神経栄養性活性を有するタンパク質またはその前駆体の生産を宿主細胞に指示できる DNA 配列の作製;
2. 宿主細胞へ移してその中で複製させることができるベクター (このベクターは DNA 配列またはその前駆体を発現させるのに必要なオペレーション要素を含有) への前記 DNA 配列のクローニング;
3. 神経栄養性タンパク質またはその前駆体をコードする DNA を発現しうる宿主細胞への、合成 DNA 配列およびオペレーション要素を含有するベクターの移入;
4. ベクターを増幅させかつタンパク質またはその前駆体を発現させる条件下での宿主細胞の培養;
5. 前記タンパク質またはその前駆体の収穫; そして
6. 前記タンパク質に活性三次構造をとらせ、それによりこのものが生物学的活性を保有するか、または生物学的活性を有するタンパク質へプロセッシングできる; ことを含んで成る。

#### 【0045】 B. DNA 配列

この方法での使用を意図される DNA 配列は実施例 1、2 および 4 で部分的に論じられる。図 6 はヒト NGF、BDNF、および NGF-3 をコードする完全な核酸配

列を示す。これらの配列には合成および天然 DNA 配列、およびそれらの組合せも含まれることが意図される。天然配列にはさらに cDNA またはゲノム DNA セグメントも含まれる。

【0046】 cDNA またはゲノムポリヌクレオチド配列によりコードされるものと同一のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列の合成的作製手段は、特にここに含まれる教示内容に照らして、当業者に一般に知られている。ポリヌクレオチドの合成に関する現在の技術の例として、Matteucci, M.D., および Caruthers, M. H., J. Am. Chem. Soc. 103:3185 (1981) および Beauchamp, S.L. および Caruthers, M.H., Tetrahedron Lett. 22: 1859 (1981)、並びに A B I オリゴヌクレオチド合成機についての説明書を挙げることができる (これらは参考文献としてここに詳細にとり込まれる)。

【0047】 これらの合成配列は以下で詳述する天然配列と同一であっても、異なるヌクレオチドを含んでいてもよい。一実施態様においては、その合成配列が本発明の天然 DNA 配列に見られるものと異なるヌクレオチドを含有する場合は、これらの異なる配列はここに記載した神経栄養性タンパク質と同じ一次構造を有するポリペプチドを依然としてコードすることが意図される。別の実施態様では、異なるヌクレオチドを含有する合成配列はここに記載した神経栄養性タンパク質と同じ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするであろう。

【0048】 さらに、その DNA 配列は天然配列の断片、すなわち自然界に存在しつつ本発明者らによって初めて単離・精製されたポリヌクレオチドの断片であってもよい。一実施態様においては、その DNA 配列は cDNA ライブラーから分離された制限断片である。別の実施態様においては、その DNA 配列はヒトゲノムライブラーから分離される。この実施態様で有用なかかるライブルーの例は Wymanら (1985) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82, 2880-2884 に記載されている。

【0049】 所望の神経栄養性タンパク質をコードする DNA 配列はいくつかの異なる方法で得ることができます。ヒト cDNA ライブルーおよびヒトゲノムライブルーを神経栄養性タンパク質遺伝子またはその遺伝子産物と結合しうる少なくとも 1 種のプローブを使って検索できる。プローブと結合するその能力によって前記タンパク質をコードする遺伝子を同定した後、その遺伝子を単離して、宿主細胞内でその遺伝子を維持・発現させるのに必要なオペレーション要素に連結することができる。

【0050】 遺伝子配列を同定・単離する別の方法はポリメラーゼ・チェイン・リアクションの使用による。実施例 1 で説明するように、ヒト BDNF をコードする天然 DNA 配列は、ブタ BDNF の核酸配列から設計された数種の合成オリゴヌクレオチドを作製し、そしてヒト BDNF 配列の増幅断片を同定するためのポリメラーゼ

・チェイン・リアクションにおいてこれらのプライマー対を利用することにより同定・単離された。PCRにより得られた増幅断片は次にヒトBDNFの全核酸配列をクローニングするのに使用された。

【0051】実施例4で説明するように、ヒトNGF-3をコードする天然DNA配列は、ヒトおよび動物NGFおよびBDNFの核酸配列から設計された合成オリゴヌクレオチドを作製し、そして以前に報告されたことのないヒトNGF-3配列の増幅断片を同定するためのポリメラーゼ・チェイン・リアクションにおいてこれらのプライマーを利用することにより同定・単離された。PCRにより得られた増幅断片はヒトNGF-3の全核酸配列をクローニングするのに使用された。

【0052】ヒトゲノムDNAライブラリーからこれらの方法により単離された、ここに記載のヒトBDNFタンパク質の少なくとも一部をコードするDNA配列は、ブダペスト条約に従って、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（メリーランド州ロックビル）に受託番号\_\_\_\_\_として寄託されている。このDNA配列は以下の実施例1で詳述する。

【0053】ヒトゲノムDNAライブラリーからこれらの方法により単離された、ここに記載のNGF-3タンパク質の少なくとも一部をコードするDNA配列は、ブダペスト条約に従って、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（メリーランド州ロックビル）に受託番号\_\_\_\_\_として寄託されている。このDNA配列は以下の実施例4で詳述する。

#### 【0054】C. ベクター

##### (i) 微生物、特にE.coli

本発明での使用が意図されるベクターには上記のDNA配列を好適な又は必要なオペレーション要素と共に挿入し、任意のベクターが包含され、このベクターは次に宿主細胞に移入されて、かかる細胞中で複製できる。特に、これらのベクターはすべて次の特徴の一部または全部をもつことが好適である：（1）最少の宿主生物配列を有する；（2）所望の宿主内に安定した状態で維持・増殖される；（3）所望の宿主内に高コピ数で存在し、（4）対象の遺伝子の転写を促進するように配置された調節可能なプロモーターを有する；（5）DNA配列が挿入される部位から離れたプラスミドの部位に存在する選択可能な特徴をコードするマーカーDNA配列を少なくとも1つ有する；および（6）転写を終結させることができるDNA配列を有する。

【0055】本発明のクローニングベクターは種々のオペレーション要素を含有する。これらの“オペレーション要素”には次のものが含まれる：調節遺伝子、プロモーター、転写ターミネーター、非翻訳配列、リボソーム結合部位、リーダー配列および翻訳カブラー、翻訳ター

ミネーター、選択マーカー。実際に、これらのベクターの単離、作製および相互交換が容易にできる方法でそれらを構築することが可能である。

【0056】ここで論じるオペレーション要素は、従来の文献とここに含まれる教示内容に照らして、当業者により日常的に選択される。これらのオペレーション要素の一般的な例はB. Lewin, Genes, Wiley & Sons, New York (1983) (参考文献としてここに詳細にとり込まれる)に記載されている。適当なオペレーション要素の種

10 タの例は先に論じたベクターに存在し、上記ベクターの基本的特徴を論じる刊行物を通して明らかになろう。

【0057】上記ベクターの必要かつ所望の全構成成分の合成および単離後に、当業者に一般的に知られた方法によりベクターが作製される。かかるベクターの作製は、当業者によって行われる職務の範囲内であると考えられ、それだけで過度の実験なしに実施することが可能である。例えば、Maniatisら Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratories (1984) (参考文献としてここに詳細にとり込まれる)に記載されるように、同様の

20 DNA配列が適当なクローニングベクターに連結されている。

【0058】以下の実施例2には、成熟ヒトNGFをコードする核酸配列を含有する2種類のベクターの作製が記載される。適当な核酸配列が挿入されたベクターはpT5TおよびpT3XI-2と呼ばれるE.coli発現ベクターである。ベクターpT5T:NGFの細部を図4に、そしてベクターpT3XI-2:NGFの細部を図5に示す。

【0059】本発明のクローニングベクターの構築においては、各ベクターに多コピ数のDNA配列とそれに付随するオペレーション要素を挿入できる点にさらに留意されたい。かかる実施態様では、宿主生物が所望の神経栄養性タンパク質をベクター当たり比較的多量に生産するであろう。ベクターに挿入できるDNA配列のコピ数は、その大きさ故に、適当な宿主細胞に移入されそこで複製および転写される作製ベクターの能力によってのみ制限される。

#### 【0060】(ii) その他の微生物

E.coli以外の微生物において使用するのに適したベクターも本発明の意図するものである。かかるベクターを表1に示す。さらに、いくつかの好適なベクターを以下で論じる。ここに記載したこれら微生物ベクターは、従来の文献とここに含まれる教示内容に照らして、当業者により日常的に使用される。かかるベクターの作製は当業者によって行われる職務の範囲内であると考えられ、それだけで過度の実験なしに実施することが可能である。

【0061】

【表1】

1

宿主	プロモーター	調節	イントロ-エクソ	転写	安定化	mRNA	開始部位 リ-ゴ-エクソ	RS結合部位
B. 34	Lac <sup>r</sup> , Trp <sup>r</sup>	Trp <sup>r</sup> pL	IPTG	rrnB <sup>r</sup>	ompA <sup>r</sup>	bla <sup>r</sup> rrbC <sup>r</sup> trp <sup>r</sup> phoS	リソビルソナ <sup>r</sup> trp <sup>r</sup> int <sup>r</sup> ケロトウルニコ-ル <sup>r</sup>	OMP <sup>r</sup> Trp <sup>r</sup> int <sup>r</sup>
				温度上昇				
			IAA 添加					
			又はリゾトロファン枯渇					
大腸菌	$\alpha$ リバ-ゲ- <sup>r</sup> • Spac <sup>r</sup>	B. 34	rrn	B. amy	Kan <sup>r</sup> 707- <sup>r</sup>	B. amy 中性 Can <sup>r</sup>	B. amy 中性 707- <sup>r</sup>	
	• p-43 <sup>r</sup>				B. amy $\alpha$ リバ-ゲ- <sup>r</sup>		B. amy $\alpha$ -リバ-ゲ- <sup>r</sup>	
	Spac-1 <sup>r</sup>	IPTG			B. subt. Spac <sup>r</sup>			
酵母	Trp <sup>r</sup> (E. 34) Lac(R. 34)	Tac (E. 34)	IAA 添加 又はリゾトロファン枯渇		C28 アミナチニシ <sup>r</sup>	Trp (E. 34)		
		Tac (E. 34)	IPTG		A <sub>34</sub> エキソキシ			
酵母	Gal 1 <sup>r</sup> , 10 <sup>r</sup>	Cycl枯渇 およ <sup>r</sup>		Ura 3 <sup>r</sup> Ura <sup>r</sup>	Ura 3 <sup>r</sup> 酸性エラスト-ゼ <sup>r</sup>	Leu 2 <sup>r</sup> $\alpha$ 因子	His 3	
	Adh 1 <sup>r</sup> , 1 <sup>r</sup>	ガルト-1 <sup>r</sup>	Sac 2 枯渇			Tap 1		
	Pho 5	ガルト-1 <sup>r</sup>						

• 非調節

[0062] 1. Backman, K., Ptashne, M. および Gilbert, W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4174-4178 (1976).  
 2. de Boer, H.A., Comstock, L.J., および Vasser, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21-25 (1983).  
 3. Shimatake, H. および Rosenberg, M. Nature 292, 128-132 (1981).  
 4. Derom, C., Cheysen, D. および Fiers, W. Gene 1, 7, 45-54 (1982).  
 5. Hallewell, R.A. および Emtage, S. Gene 9, 27-47 (1980).  
 6. Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D. および Noller, H.F. J. Mol. Biol. 148 107-127 (1981).  
 7. Normanly, J., Ogden, R.C., Horvath, S.J. および Abelson, J. Nature 321, 213-219 (1986).  
 8. Belasco, J.G., Nilsson, G., von Gabain, A. および Cohen, S.N. Cell 46, 245-251 (1986).  
 50 9. Schmeissner, U., McKenney, K., Rosenberg, M. および

よび Court, D. J. Mol. Biol. 176, 39-53 (1984).

10. Mott, J.E., Galloway, J.L. および Platt, T. EMB O J. 4, 1887-1891 (1985).

11. Koshland, D. および Botstein, D. Cell 20, 749-760 (1980).

12. Movva, N.R., Kakamura, K. および Inouye, M. J. Mol. Biol. 143, 317-328 (1980).

13. Surin, B.P., Jans, D.A., Fimmel, A.L., Shaw, D.C., Cox, G.B. および Rosenberg, H. J. Bacteriol. 157, 772-778 (1984).

14. Sutcliffe, J.G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3737-3741 (1978).

15. Peden, K.W.C. Gene 22, 277-280 (1983).

16. Alton, N.K. および Vapnek, D. Nature 282, 864-869 (1979).

17. Yang, M., Calizzi, A., および Henner, D. Nuc. Acids Res. 11(2), 237-248 (1983).

18. Wong, S.-L., Price C.W., Goldfarb, D.S., および Doi, R.H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1184-1188 (1984).

19. Wang, P.-Z. および Doi, R.H. J. Biol. Chem. 25 1, 8619-8625, (1984).

20. Lin, C.-K., Quinn, L.A., Rodriguez, R.L. J. Cell Biochem. Suppl. (9B), p. 198 (1985).

21. Vasantha, N., Thompson, L.D., Rhodes, C., Bannister, C., Nagle, J., および Filpula, D. J. Bact. 159 (3), 811-819 (1984).

22. Plava, I., Sarvas, M., Lehtovaara, P., Sibazkov, M., および Kaariainen, L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5582-5586 (1982).

23. Wong, S.-L., Price, C.W., Goldfarb, D.S., および Doi, R.H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1184-1188 (1984).

24. Sullivan, M.A., Yasbin, R.E., Young, F.E. Gene 29, 21-46 (1984).

25. Vasantha, N., Thompson, L.D., Rhodes, C., Bannister, C., Nagle, J., および Filpula, D.J. Bact. 159 (3), 811-819 (1984).

26. Yansura, D.G. および Henner, D. J. PNAS 81, 439-443 (1984).

27. Gray, G.L., McKeown, K.A., Jones, A.J.S., Seeburg, P.H. および Heyneker, H.L. Biotechnology, 161-165 (1984).

28. Lory, S., および Tai, P.C. Gene 22, 95-101 (1983).

29. Liu, P.V. J. Infect. Dis. 130 (suppl), 594-599 (1974).

30. Wood, D.G., Hollinger, M.F., および Tindol, M. B. J. Bact. 145, 1448-1451 (1981).

31. St. John, T.P. および Davis, R.W. J. Mol. Biol.

152, 285-315 (1981).

32. Hopper, J.E., および Rowe, L.B. J. Biol. Chem. 253, 7566-7569 (1978).

33. Denis, C.L., Ferguson, J. および Young, E.T. J. Biol. Chem. 258, 1165-1171 (1983).

34. Lutsdorf, L. および Megnet, R. Archs. Biochem. Biophys. 126, 933-944 (1968).

35. Meyhack, B., Bajwa, N., Rudolph, H. および Hinnen, A. EMBO J. 6, 675-680 (1982).

10 36. Watson, M.E. Nucleic Acid Research 12, 5145-5164 (1984).

37. Gerband, C. および Guerineau, M. Curr. Genet. 1, 219-228 (1980).

38. Hinnen, A., Hicks, J.B. および Fink, G.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929-1933 (1978).

39. Jabbar, M.A., Sivasubramanian, N. および Nayak, D.P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2019-2023 (1985).

(a) シュードモナスベクター

20 広範囲のグラム陰性細菌内で自律複製する数種のベクタープラスミドが、シュードモナス (Pseudomonas) 属宿主におけるクローニングベヒクルとして使用するのに好適である。これらのうちのいくつかは Tait, R.C., Cloise, T.J., Lundquist, R.C., Hagiya, M., Rodriguez, R.L., および Kado, C.I., Biotechnology, May, 1983, p. 269-275; Panopoulos, N.J., Genetic Engineering in the Plant Sciences, Praeger Publishers, New York, New York, p. 163-185 (1981); および Sakaguchi, K., Current Topics in Microbiology and Immunology 9 6: 31-45 (1982) (それぞれ参考文献としてここに詳細にとり込まれる) に記載されている。

【0063】特に好適な構築は、Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M., Coleman, S., および Timmis, K.N., Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance, Timmis, K.N. および Puhler, A. 編, Elsevier/North Holland Biomedical Press (1979) (参考文献としてここに詳細にとり込まれる) に記載されるプラスミド R S F 1 0 1 0 およびその誘導体を用いるであろう。この R S F 1 0 1 0 の利点は、それが E. coli とシュードモナス種の両方に容易に形質転換されかつ安定した状態で維持される、比較的小型の、高コピー数プラスミドであるということである。この系では、エシェリヒアのところで述べたような T a c 発現系を使用するが好適であろう。何故ならば、E. coli t r p プロモーターは、Sakaguchi, K., Current Topics in Microbiology and Immunology 96: 31-45 (1982) および Gray, G.L., McKeown, K.A., Jones A.J.S., Seeburg, P.H., and Heyneker, H.L., Biotechnology, Feb. 1984, p. 161-165 (両方とも参考文献としてここに詳細にとり込まれる) に記載されるように、シュードモナス RNA ポリメラーゼ

せにより容易に認識されると思われるからである。転写活性はプロモーターを例えば *E.coli* または *ショードモナス・アエルギノザ* (*P. aeruginosa*) *t r p* プロモーターと交換することにより最大限に高めることができる。さらに、*E.coli* の *l a c I* 遺伝子も調節を行うためにこのプラスミドに含まれよう。

【0064】翻訳は神経栄養性タンパク質の細胞内発現をもたらすように選ばれた種類の任意の高度発現タンパク質の開始部位だけでなく、任意のショードモナスタンパク質の翻訳開始にも連結することができる。宿主ショードモナス種の制限マイナス株を利用できない場合は、*E.coli* から単離したプラスミド構築物による形質転換効率が低い。従って、*Bagdasarian, M.*, *ら* Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance, p. 411-422, *Timmis* および *Puhler* 編, *Elsevier/North Holland Biomedical Press* (1979) (参考文献としてここに詳細にとり込まれる) に記載されるように、ショードモナス・クローニングベクターは所望の宿主の形質転換に先立って別の種の *r - m +* 株を通過させることが望ましい。

#### 【0065】(b) パチルスペクター

さらに、パチルス属宿主における好適な発現系はクローニングベヒクルとしてのプラスミド *pUB 110* の使用を含む。他の宿主ベクター系と同様に、パチルスでは本発明の神経栄養性タンパク質を細胞内タンパク質または分泌タンパク質として発現させることができ。この実施態様は両方の発現系を包含する。パチルスと *E.coli* の両方において複製するシャトルベクターは、*Dubnau, D.*, *Gryczan, T.*, *Contente, S.*, および *Shivakumar, A.G.*, Genetic Engineering, Vol. 2, *Setlow* および *Hollander* 編, *Plenum Press*, *New York*, *New York*, p. 115-131 (1980) (参考文献としてここに詳細にとり込まれる) に記載されるように、種々の遺伝子の構築および試験に利用できる。*B.ズブチリス* (*B. subtilis*) からの神経栄養性タンパク質の発現および分泌に関しては、 $\alpha$ -アミラーゼのシグナル配列が好ましくはこのタンパク質のコード領域に連結される。細胞内タンパク質の合成に関しては、移動可能なDNA配列が $\alpha$ -アミラーゼリーダー配列のリボソーム結合部位に翻訳共役されよう。

【0066】これらの構築物の転写は好ましくは $\alpha$ -アミラーゼプロモーターまたはその誘導体により指示される。この誘導体は天然 $\alpha$ -アミラーゼプロモーターのRNAポリメラーゼ認識配列を含有するが、また *l a c O* ベレーター領域も組み込む。ベニシリナーゼ遺伝子プロモーターと *l a c O* ベレーターから構築された同様のハイブリッドプロモーターは、*Yansura, D.G.* および *Herner, Genetics and Biotechnology of *Bacillus**, *Ganesan, A.T.* および *Hoch, J.A.*, 編., *Academic Press*, p. 249-263 (1984) (参考文献としてここに詳細にとり込まれる) に記載されるように、パチルス宿主において調節可能な様式で機能することが示されている。

れる) に記載されるように、パチルス宿主において調節可能な様式で機能することが示されている。*E.coli* の *l a c I* 遺伝子も調節を行うためにこのプラスミドに含まれよう。

#### 【0067】(c) クロストリジウムベクター

クロストリジウム (*Clostridium*) による発現に好適な構築物の一つは、*Squires, C.H.* ら, *J. Bacteriol.* 159: 465-471 (1984) (参考文献としてここに詳細にとり込まれる) に記載されるプラスミド *pJU12* 中で行われ、この構築物は *J. Bacteriol.* 159: 460-464 (1984) (参考文献としてここに詳細にとり込まれる) に記載される *Heefner, D.L.* らの方法によりクロストリジウム・バーフリンジエンス (*C. perfringens*) に形質転換される。転写はテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーターにより指示される。翻訳は他の宿主で使用するのに適したベクターについて先に概説した方法と厳密に類似した方法での同じ *t e t* 遺伝子のシャイン・ダルガーノ配列に連結される。

#### 【0068】(d) 酵母ベクター

20 酵母に導入された外来DNAの維持は、*Botstein, D.* および *Davis, R.W.*, The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, *Cold Spring Harbor Laboratory, Strathern, Jones* および *Broadbent, J.* 編, p. 607-636 (1982) (参考文献としてここに詳細にとり込まれる) に記載されるいくつかの方法で行うことができる。サッカロミセス属の宿主生物で使用するのに適した一発現系は2ミクロンプラスミド上に神経栄養性タンパク質遺伝子を保有する。この2ミクロン環状プラスミドの利点には *c i r'* 株に導入した場合の比較的高いコピー数および安定性が含有される。これらのベクターは好ましくは *E. coli* での複製および選択を可能にするために、*pBR322* 由来の複製起点および少なくとも1つの抗生物質耐性マーカーを組み込んでいる。さらに、このプラスミドは好ましくは酵母の *LEU2* 欠損変異株において同じ目的をとげるために、2ミクロン配列および酵母 *LEU2* 遺伝子を有しよう。

【0069】組み換え神経栄養性タンパク質を最終的に酵母に発現させようとする場合は、初めにクローニングベクターを *E. coli* に移し、そこでベクターを複製させ、そして増殖後にベクターを回収して精製することが好適である。その後、ベクターはタンパク質の最終的発現のために酵母に移入されよう。

#### (iii) 哺乳動物細胞

神経栄養性タンパク質のcDNAは哺乳動物細胞によるタンパク質発現用の遺伝子として役立てられよう。それは *Kozak, Nucleic Acids Research* 15: 8125-8132 (1987) (参考文献としてここに詳細にとり込まれる) に記載されるようなリボソーム結合に効果的な配列をもつべきであり、さらにプロセッシングされた形における成熟タンパク質を細胞外へ導くリーダー配列 (セクション3)

(a) (vi) 参照) のコード能力をもつべきである。完全な c DNA 配列を担持する DNA 制限断片は、Guarente, L., Cell 52:303-305 (1988) および Kadonaga, J.T. ら Cell 51:1079-1090 (1987) (両方とも参考文献としてここに詳細にとり込まれる) に記載されるような、転写プロモーターおよび転写エンハンサーを有する発現ベクターに挿入できる。タンパク質の構成的発現が細胞の増殖に有害である場合、プロモーターはプラスミド pMSG (Pharmacia カタログ番号 27450601) におけると同様に調節可能であることができる。ベクターは、そのベクターから転写された mRNA が適正にプロセッシングされるように、Ausubel, F.M. ら, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley (1987) (参考文献としてここに詳細にとり込まれる) に記載されるような、完全なポリアデニル化シグナルを有するべきである。最後に、ベクターは *E. coli* での複製および選択ができるように、pBR322 由来の複製起点および少なくとも 1 つの抗生物質耐性マーカーを有しよう。

【0070】神経栄養性タンパク質を生産する安定した細胞株を選別するために、発現ベクターは薬剤耐性マーカーのような選択マーカーの遺伝子を担持できるし、または Ausubel ら同上に記載されるような d h f r 細胞系を形質転換するための、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (d h f r) 遺伝子のような、欠損細胞系用の補足遺伝子を担持できる。あるいはまた、選択マーカーを担持する別個のプラスミドを発現ベクターと同時に形質転換に使用することもできる。

#### 【0071】D. 宿主細胞/形質転換

このようにして得られたベクターは、適当な宿主細胞へ移入される。これらの宿主細胞は微生物、昆虫細胞または哺乳動物細胞であろう。本発明の好適な実施態様では、使用される宿主細胞は微生物でありそしてより詳しくは *E. coli* 細胞である。

#### 【0072】(i) 微生物

外因性 DNA をとり込みかつそれらの遺伝子と付随するオペレーション要素を発現しうる任意の微生物を選択できると考えられる。宿主生物を選択した後、ベクターを当業者に一般的に知られた方法を使って宿主生物に移入する。かかる方法の例は R.W. Davis ら, Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, (1980) (参考文献としてここに詳細にとり込まれる) に見ることができる。一実施態様では、温度調節が上記のようなオペレーション要素の使用を介した遺伝子発現の調節手段として意図されるので、形質転換は低温で起こることが好適である。他の実施態様においては、浸透調節遺伝子がベクターに挿入された場合は、外来性遺伝子の適切な制御を確保するために、形質転換期間中塩濃度の調節が必要であろう。

【0073】宿主微生物が通性嫌気性菌または好気性菌であることが好適である。この方法で使用するのに好ま

しい詳細な宿主には酵母および細菌が含まれる。詳細な酵母にはサッカロミセス属のもの、特にサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) が含まれる。詳細な細菌にはパチルス属、エシェリヒア属、およびシュードモナス属のもの、特にパチルス・ズブチリスおよびエシェリヒア・コリが含まれる。他の宿主細胞は表 1 に示してある。

#### 【0074】(ii) 哺乳動物細胞

ベクターはリノ酸カルシウム: DNA 共沈、エレクトロポレーション、またはプロトプラスト融合のようないくつかの技法により培養下の哺乳動物細胞に導入できる。好適な方法は Ausubel ら同上に記載されるようなリノ酸カルシウム共沈法である。

【0075】形質転換可能であり、しかも c DNA 配列を転写・翻訳し、前駆体神経栄養性タンパク質をプロセッシングしそして成熟タンパク質を分泌することができる安定した細胞型が数多く存在する。しかしながら、細胞型は、もし起こるとしたら、分泌タンパク質のグリコシル化およびアミノ酸残基の翻訳後修飾に関して変動できよう。従って、理想的な細胞型は天然分子と同一の組み換え神経栄養性タンパク質を生産するものである。

#### E. 工学的に作製された細胞の培養

神経栄養性タンパク質の発現に適した条件下宿主細胞を培養する。これらの条件は一般に宿主細胞に特異的であり、かかる細胞の増殖条件に関する刊行された文献および本明細に含まれる教示に照らして、通常の技術を有する者が容易に決定できる。例えば、Bergery's Manual of Determinative Bacteriology, 第 8 版, Williams & Wilkins Company, Baltimore, Maryland は、参考文献として詳細に本文にとり込まれるが、これには細菌培養条件に関する情報が載っている。酵母および哺乳動物細胞の培養に関する同様の情報は、Pollack, R. Mammalian Cell Culture, Cold Spring Harbor Laboratories (1975) から得られ、これは参考文献として詳細に本文にとり込まれる。

【0076】DNA 配列の発現調節に必要な任意の条件は、ベクター内に挿入されるかまたはベクター中に存在する任意のオペレーション要素に依存し、形質転換および培養段階で効力を發揮するであろう。ある実施態様に於ては、DNA 配列の発現を阻害する適当な調節条件の存在下細胞を高密度に増殖させる。最適な細胞密度に達したときに、周囲の条件を DNA 配列の発現に適した条件に変化させる。こうして、宿主細胞が最適密度近くまで増殖した後の一定時間に神経栄養性タンパク質を生産させること、およびその結果生じるタンパク質をその発現に必要な調節条件を誘導した後の一定時期に収集することが意図される。

#### 4. 発現した組換えタンパク質の再生

本発明の好ましい実施態様に於ては、組換え成熟神経栄養性タンパク質を収集後、その活性構造をとらせる前に

精製する。当該タンパク質を最初に精製する場合は再生タンパク質を高收率で回収することが容易になると本発明者らは考るるので、この実施態様が好ましい。しかしながら、もう一つの好ましい別の実施態様に於いては、精製前に神経栄養性タンパク質を再生してその活性構造をとることを可能にすることができる。さらに別の好ましい実施態様に於ては、このタンパク質は培養培地から回収した時点で、再生された活性な状態で存在する。

【0077】ある特定の状況に於ては、成熟神経栄養性タンパク質は、宿主微生物内で発現し、細胞壁または細胞膜を通って、または細胞周辺腔へ輸送される時点で、当該タンパク質の適正で、活性な構造をとるであろう。このことは、一般に、適当なリーダー配列をコードするDNAが当該の組換えタンパク質をコードするDNAに連結されている場合に起こるであろう。

【0078】本発明のある実施態様に於ては、微生物内で生産されたタンパク質は実質的な生物活性を欠く可能性があり、したがってこれを再生して、神経栄養性タンパク質にNGF/BDNF群の一員として期待される生物学的特異活性を付与する必要があろう。予想される特異活性は、真核細胞で発現されたタンパク質について観察されるかあるいはまた、天然起源から精製された同一または関連タンパク質について観察されるものどちらかである（例えば、マウス頸下腺NGFおよびブタ脳BDNF）。

【0079】微生物で発現されたタンパク質に生物活性がないのは、分子内ジスルフィド結合が正しく形成されないことに関係している場合が多い。このような実施態様の好ましい一局面に於ては、E.コリ内で生産された組換え神経栄養性タンパク質を再生して、分子内ジスルフィド結合の正確な配置および予想される生物学的特異活性を得ることができる。

【0080】好ましい局面に於ては、組換えタンパク質を以下の工程を用いて再生することができる：

(1) 微生物内で生産された成熟神経栄養性タンパク質に関して生じたあらゆる分子内または分子間ジスルフィド結合、および/またはあらゆる非共有結合性相互作用を、まず破壊する。これを行うために、タンパク質を十分な変性剤（例えば、塩酸グアニジンまたは尿素）、および十分な還元剤（例えば、β-メルカプトエタノール、ジチオトレイトール、またはシステイン）に曝してタンパク質を変性させ、非共有結合性相互作用を破壊し、ジスルフィド結合を還元する。

【0081】(2) 成熟神経栄養性タンパク質を変性および還元した後、還元タンパク質に存在する遊離のチオール基を大過剰のジスルフィド含有試薬（例えば、グルタチオンまたはシステイン）の添加によって酸化する。この反応により、成熟神経栄養性タンパク質中の各システイン残基が酸化剤の单量体形とジスルフィド結合を形成するものである混合ジスルフィド結合が形成される。こ

の工程によって、後続のプロセッシングで神経栄養性タンパク質に間違った分子内ジスルフィド結合が形成されるのを阻止できる。

【0082】(3) 次に、変性剤および酸化剤を所定濃度に希釈し、そしてジスルフィド結合の架け替えを触媒するためにチオール含有試薬（例えばシステイン）を添加する。その目的は、変性剤濃度を十分に低下させて神経栄養性タンパク質が様々な三次元構造をとることを可能にする環境を作ることであり、また酸化/還元ポテンシャルを調整してジスルフィド結合の形成および破壊を可能にする環境を作ることである。成熟神経栄養性タンパク質の正しい三次元構造およびジスルフィド結合バターンは、他のあらゆるコンホーメーションに比べてエネルギー的に安定であると考えられている。したがって、神経栄養性タンパク質が様々な三次元コンホーメーションおよび分子内ジスルフィド結合バターンをとることを可能にする条件により、神経栄養性タンパク質のかなりの割合が正しい分子内ジスルフィド結合バターン、正しい三次元構造、を再生し、したがって生物学的に活性となることが可能となる。

【0083】好ましい実施態様に於ては、組換え神経栄養性タンパク質を尿素含有バッファー中に0.1-2mg/ml濃度となるように溶解する。もし必要ならば、ジスルフィド結合の架け換えを促進するために、やはり尿素を含有する高pHバッファー溶液を添加することによって、かかる溶液のpHをアルカリ性とす。還元剤を最終濃度約1-15mMとなるように添加する。次に、酸化剤を最終濃度約15-50mMとなるように添加する。神経栄養性タンパク質含有溶液を5-20倍に希釈し、その溶液がジスルフィド含有試薬より2-3倍多いチオール含有試薬を含有するような濃度まで、チオール含有試薬を加える。

【0084】組換え神経栄養性タンパク質の再生に関するもっとも好ましい実施態様に於いては、最終的な再生混合物を脱気し、そして嫌気性条件で再生が起こるようになる。さらに、本発明のもっとも好ましい実施態様に於いては、NGF溶液は再生前に他のタンパク質から実質的に精製される。この文脈で実質的に精製されるとは、その溶液が、NGF再生の速度または効率を妨げる宿主細胞タンパク質を実質的に含まないと意味する。そして最終的に、本発明の好ましい実施態様に於いては、グリコール含有試薬もまた再生混合物に含まれる。

【0085】これらの方法は穏やかで、神経栄養性タンパク質の化学的修飾をもたらすべきでない。このプロトコルで変性剤として尿素を用いる場合は、生じる可能性のあるシアノ酸イオンを尿素溶液をDOWEX1-X8 (BioRad)のような陰イオン交換カラムに通すことによって除去することが重要である。シアノ酸イオンを除去しないと、タンパク質中のアミノ基が修飾される可能性がある (St

ark 1967 Methods in Enzymology 11: 125)。

【0086】最終再生溶液に於ける変性剤、酸化剤、チオール試薬およびそれらの濃度の選択および最適濃度は、正しく再生され生物学的に活性な神経栄養性タンパク質の割合をモニターすることによって実験的に決定される。最終再生溶液に於ける目標は、好ましいコンホーメーションおよびジスルフィド結合パターンが達成されるまで、神経栄養性タンパク質にジスルフィド結合の架け換えとコンホーメーション変化が起こり得る制御された環境を与えることである。上記した最適な再生にとって好ましい条件は、NGF/BDNF群の神経栄養性タンパク質のすべてについて実質的に同一であることが予想されるが、それはこれらのタンパク質が、成熟タンパク質中の全部で6個のシステイン残基の相対位置を含めて、アミノ酸配列に於いて密接に関連しているためであり、したがって同一のジスルフィド結合パターンをとると推定されるからである。

【0087】本発明の再生に関する実施態様により、生物学的に活性な神経栄養性タンパク質を生じないことが示されている望ましい発現系において神経栄養性タンパク質を発現できる。本発明の方法を行った後、細菌で発現された組換え神経栄養性タンパク質は、最低10%の生物活性を獲得するであろう。より好ましい実施態様に於いては、神経栄養性タンパク質は少なくとも30%の生物活性を得るであろう。最も好ましい実施態様に於いては、当該タンパク質は少なくとも50%の生物活性を有するであろう。

【0088】下記の実施例3は、この再生プロトコルが細菌で生産される成熟NGFの再生に有効であることを示す実験について、以下のように説明する：

(1) 真核細胞発現で生産されるかあるいは天然起源から精製された、正しく折りたたまれ完全に生物学的に活性な成熟NGFを上記のように変性させてジスルフィド結合を還元し、生物活性を失わせる。このNGFは変性および還元以前は生物学的に活性であったので、生物活性の喪失によって変性および再生が起こったことを証明できる；(2) 変性させ還元させたNGFを、本文記載のプロトコルにしたがって再生し、生物活性が回復されたことを判定する。生物活性の回復は、変性され還元されたタンパク質の適正な再生にかかっていると推定される。細菌細胞発現系も含めて、上記のどの起源に由来する成熟NGFも、変性および還元後は構造的に区別できないと主張されている。したがって、真核細胞発現系または天然起源のいずれかに由来する変性され還元された成熟NGFを適正に再生できることは、細菌細胞で生産された成熟NGFをうまく再生できることを示す(実施例3および図3参照)。

【0089】実施例3Bは、上記と同様の方法を用いた、E.コリを使用する細菌発現系で生産された成熟NGFの再生の成功を説明する。再生されたNGFは完全

に生物学的に活性で、逆相高性能液体クロマトグラフィーで天然型の、昆虫細胞で生産されたNGFの位置で移動する。

#### 5. 組換え神経栄養性タンパク質の精製

最も利用し易く、高収率で生物学的に活性なタンパク質を生じることが経験的に確認されている、成熟神経栄養性タンパク質を再生するための上記プロトコルは、組換えタンパク質の精製の段階に適用できる。

【0090】本発明の一実施態様に於いては、NGF/

10 BDNF群の組換え体は、タンパク質化学の標準的な技法によって、その組換えタンパク質が医薬製剤中に使用するに十分に純粋となるまで発現宿主細胞の抽出物から精製できる。かかる純度は、調製物中の全タンパク質の最低90%が神経栄養性タンパク質であること、そして好ましくは全タンパク質の最低95%が神経栄養性タンパク質であることと定義される。好ましい実施態様に於いては、組換えタンパク質の精製に用いられる方法には、下記の一部またはすべてが含まれうるが、それらに限定されない：イオン交換クロマトグラフィー(例、Q-、  
20 S-、およびDEAE-セファロースイオン交換カラム)、ゲル浸透クロマトグラフィー(例、セファロースサイシングカラム)、クロマトフォーカシング(例、Mono-Pカラム)、疎水性相互作用クロマトグラフィー(例、オクチルー、およびフェニルーセファロースHICカラム)、アフィニティクロマトグラフィー(例、亜鉛、銅、および水銀金属-アフィニティーカラム)。

#### 6. 医薬製品の製剤

前記のように、本発明の神経栄養性タンパク質は、治療剤としての使用を意図されており、したがって製薬上許容される担体中に製剤化されることが意図される。本発明の一実施態様に於いては、神経栄養性タンパク質を化学的に修飾して、その分子の運動学的性質を向上させることができる。一例は、ポリエチレングリコールのような高分子量ポリマー物質の神経栄養性タンパク質への結合である。神経栄養性タンパク質は、治療すべき神経細胞障害の種類に応じて、個別にか、NGF/BDNF群の別の神経栄養性タンパク質と組み合わせてか、または他の神経栄養性タンパク質または他の治療薬と組み合わせて投与できる。

40 40 【0091】本発明の治療用組成物は注射によって非経口的に、または埋め込まれたポンプからの持続的な注入によって鞘内に投与することが好ましい。また、非経口的徐放性製剤、吸入ミスト、経口で活性な製剤、または坐薬のような他の有効な投与形態も意図される。好ましい担体の一つは生理食塩溶液であるが、他の製薬上許容される担体も使用できることが意図される。好ましい実施態様の一つに於いては、担体および神経栄養性タンパク質が生理学的に適合する徐放性製剤を構成することが意図される。かかる担体に於ける主要な溶媒は本質的に水性であっても非水性であってもよい。さらに、担体

は、製剤の pH、浸透性、粘度、透明度、色、無菌性、安定性、溶解速度、またはにおいを改変もしくは維持するために、他の薬理学的に許容される賦形剤をも含有できる。同様に、担体はさらに、神経栄養性タンパク質の安定性、溶解速度、放出または吸収を改変もしくは維持するために、他の薬理学的に許容される賦形剤をも含有できる。かかる賦形剤は、単位量または複数回量における非経口投与用製剤に、あるいは埋め込まれたポンプからの持続的または定期的注入によるかまたは鞘膜内への定期的な注射による鞘膜内デリバリーのための製剤に通常慣用的に使用される物質である。

【0092】ひとたび治療用組成物が製剤化されると、その組成物は溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水もしくは凍結乾燥した粉末として、滅菌バイアル中に保存できる。かかる製剤は、すぐ使用できる形でまたは投与直前に再構成を必要とする形態で保存できる。かかる製剤の好ましい保存は、少なくとも4°C程度の低温で行われ、-70°Cが好ましい。また、神経栄養性タンパク質を含有するかかる製剤は生理的pHまたはその付近で保存され投与されるのが好ましい。現在では、約pH5.5より低いpH、および約8.0より高いpHで製剤を保存し、投与することは望ましくないと考えられている。

【0093】神経栄養性タンパク質を含有する製剤を非経口的に投与する方法は、皮下または筋肉内ルートによることが好ましい。望ましい量の神経栄養性タンパク質を得るには、毎日繰り返しまたはより低頻度で皮下または筋肉内注射を行うことができる。約0.01mg/kgより低い用量で毎日神経栄養性タンパク質を投与することは効果がなく、一方1mg/kgより高い用量で毎日投与すること\*30

\*とは望ましくない副作用をもたらすと考えられている。また、神経栄養性タンパク質を含有するある種の製剤を経口投与することも意図される。この様式で経口投与される神経栄養性タンパク質はカプセル封入されることが好ましい。カプセル化された神経栄養性タンパク質は、固体投与形の製剤化に通常用いられる担体を用いてまたは用いて製剤化できる。カプセルは、その製剤の活性部分が、生物利用可能性が最大となり、そして全身に行きわたる前の分解が最小となる時点で胃腸管内に放出されるように設計されることが好ましい。神経栄養性タンパク質の吸収を促進するために、付加的な賦形剤を包含することができる。希釈剤、香料、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、および結合剤も使用できる。

【0094】投与様式に関わらず、特定の用量が患者のおよその体重にしたがって算出される。上記各製剤が関わる治療に適した用量を決定するのに必要な計算の一層の改善は、当業者によってルーチンに行われ、それは過度の実験を行うことなく当業者によってルーチンに行われる業務の範囲内である。生物試験では、本発明の神経栄養性タンパク質を用いても、毒性作用はまったく観察されない。

実施例1：BDNFのヒト遺伝子の単離、配列決定および発現

A. ヒトBDNF遺伝子の部分を増幅するためのポリメラーゼ・チェイン・リアクションの利用  
ブタBDNFについて報告された核酸配列に基づいて、以下のオリゴヌクレオチドを合成した (Leibrockら、1989上記)。

BDNF-1 [ブタBDNFの第5番目のコード塩基のすぐ上流に位置し、また5' BamHI部位をも含有する、縮重していないセンスストランドオリゴ]  
5' GGA TCC GGT GAG AAG AGT GAT GAC 3'

BDNF-2 [ブタBDNFの開始コドンから下流に連なる、部分的に縮重した推定センスストランドオリゴ；このオリゴは縮重を減らすために二つの異なるブールで合成された；推定物は、哺乳動物のコドン使用の選択を利用することによって縮重を減らしたオリゴヌクレオチドである]  
BDNF-2A  
5' ATG ACN ATC/A/T CTG TTT/C CTG ACN  
ATG 3'

BDNF-2B  
5' ATG ACN ATC/A/T CTG TTT/C CTC ACN  
ATG 3'

BDNF-3 [ブタBDNFの終止コドンのすぐ下流に位置し、また5' SpeI部位をも含有する、縮重していないアンチセンスストランドオリゴ]  
5' ACT AGT TAA TCT ATA CAA CAT AAA  
GCC 3'

BDNF-4 [ブタBDNFの終止コドンから上流に連なる、部分的に縮重した推定アンチセンスストランドオリゴ]

5' ATN GTG/C AGN GTA/G CAN ACA/G CA 3'

BDNF-5 [成熟(プロセシングを受けた)BDNFタンパク質のコード領域に存在する縮重したセンスストランドオリゴ]

5' GAT/C AAA/G AAA/G ACN GCN GTN  
GAT/C ATG 3'

ヒトゲノムDNAを錆型として用い、以下の組合せの合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR反応を行った：BDNF-1およびBDNF-3；BDNF-2AおよびBDNF-3；BDNF-2BおよびBDNF-3；BDNF-2AおよびBDNF-4；BDNF-2BおよびBDNF-4；および、BDNF-1およびBDNF-4。反応産物を電気泳動にかけ、そして放射性標識BDNF-5をプローブとして用いてDNA(サザン)プロットを探査し、ヒトBDNFに相当する可能性のある増幅フラグメントを同定した。詳細については本実施例の実施補遺参照。

【0095】おおよそ予想される分子量の位置に、プライマーとしてBDNF-1/BDNF-3、BDNF-2A/BDNF-3、およびBDNF-2B/BDNF-3を用いた反応でBDNF-5とハイブリッド形成するバンドが存在した。電気泳動したBDNF-1/BDNF-3反応混合物に由来する、ハイブリッド形成したサザンバンドの位置のDNAをゲルから切り出し、一部をとって、配列決定プライマーとしてBDNF-1およびBDNF-3を用いて直接配列決定し、BDNFコード領域内のヒト遺伝子の部分配列を得た(図1)。この増幅されたDNAの残りをSmaI切断ファージM13mp10cサブクローニングし、放射性標識BDNF-5とのハイブリッド形成に基づいて陽性サブクローンを選択した。二つの相互に無関係な、反対方向の陽性サブクローン、BDNF-PCR1および2を配列決定し、BDNFコード領域内におけるヒト遺伝子の配列を得た(図1)。

B. BDNFヒト遺伝子をクローニングするためのPCR増幅DNAの使用

増幅されハイブリッド形成したサザンバンドの位置にあるDNAを放射性標識し、これを用いてファージラムダEMBL3におけるヒトゲノムDNAライブラリーをスクリーニングした。6個の陽性クローンがブラーク精製された。クローン#3由来DNAを下記の制限酵素で別々に消化した：HinfI；AluI；RsaI；およびNcoI/Sau3AI。これらの酵素を選択したのは、それらがBDNFコード配列をM13にクローニングするのに適した大きさのいくつかのフラグメントに切断するからである。BDNFコード配列を含有する制限フラグメントをファージM13mp10cサブクローニングし、配列決定して、BDNF

コード領域に於けるヒト遺伝子の配列を確認した(図1)。図1はまた、前駆体および成熟(プロセシングを受けた)ヒトBDNFタンパク質の推定アミノ酸配列をも示す。図1で提案された切断部位はNGFおよびブタBDNFの既知配列、およびNGFおよびブタBDNFの既知アミノ酸配列における切断部位の類似性に基づく。

【0096】PCR増幅フラグメントから得られたBDNF配列(図1)、およびヒトゲノムDNAクローンから得られたBDNF配列は第196位の核酸が異なる。ヒトゲノムクローンは196位のGの代わりにAを有し、これによってアミノ酸66がバリンからメチオニンに変化する。この相違は前駆体で生じ、BDNFの生物学的活性形である成熟型では起こらない。一つの塩基対および一つのアミノ酸のこの変化は、ヒトゲノム内のBDNF配列に於ける対立遺伝子の差異を表す可能性がある。

【0097】付加的なクローンの配列決定によって、図1に示すのと同一の配列が得られた。ただし、223位のアミノ酸はアルギニン(R)の代りにリシン(K)であり、そのコドンはAGAの代わりにAAAであった。この差異はヒトBDNFの生物学的に活性な成熟型に生じる。これは、この位置での代替ヒト対立遺伝子を表すかもしれない。

C. COS-7細胞に於ける生物学的に活性なBDNFの発現

本発明者らが得たヒトBDNF遺伝子が、実際に生物学的に活性なBDNFをコードしていることを確認するために、その遺伝子を一時的にCOS-7細胞で発現させ、そして発現された物質を、ブタ脳から精製されたBDNFの既知性質である、培養中のニワトリ胚(10日)後根神経節ニューロンの生存を促進する能力に関してアッセイした(Bardeら、1982 The EMBO Journal 1: 549)。

【0098】

1. ヒトBDNF発現のためのDNA構築物の作製  
上記B項のよう作製し、オリゴヌクレオチドBDNF-1およびBDNF-3を用いるPCRによってヒトゲノムDNAから増幅した、ヒトBDNFコード配列を含有するゲル精製DNAを、COS細胞発現ベクターpSG5(=Greenら、1988 Nuc. Acids Res. 16: 369)に連結

した。プラスミド pSG5 を制限エンドヌクレアーゼ EcoRI および BamHI で消化し、付着末端を 4 種すべてのデオキシリボヌクレオチドの存在下で DNA ポリメラーゼ I のクレノウフラグメントで処理することにより平滑化した。次に、完全な BDNF コード配列を含有するゲル精製 DNA を、末端を平滑化した pSG5 に連結した。COS 細胞内へのトランスフェクションに際して、SV40 極初期プロモーターから BDNF 前駆体タンパク質を発現できる挿入 DNA の方向は、制限マッピングによって同定される。望ましい方向において、BDNF 挿入物は BamHI および BglIII で消化後にベクターから分離できる。

【0099】2. COS 細胞のトランスフェクション BDNF コード挿入物を有する pSG5 由来 DNA および同挿入物を有しない同 DNA をアルカリ溶解および統く CsCl 密度遠心によって調製した (Maniatis ら、上記)。製品使用説明書 (BRL) のプロトコル C にしたがって、リポフェクチンを用いてこのプラスミド DNA を COS-7 細胞にトランスフェクションした。BDNF コード挿入物を含有しないプラスミド DNA でトランスフェクションした COS 細胞培養物を陰性対照として使用した。

【0100】3. 発現産物のバイオアッセイ トランスフェクション 24 時間後、細胞を皿から掻き取り、短時間の遠心によって収集した。細胞ペレットを氷上で、1 mM EDTA、0.1 mM PMSF、および 0.1 μM ベプスタチン含有 20 mM リン酸ナトリウム、pH 6.7 中での短時間の音波処理によって抽出した。各培養物からの細胞抽出物の連続希釈物を、ニワトリ胚 (10 日) 後根神経節ニューロンを用いて生物活性についてアッセイした (実施例 3 の実験補遺参照)。有意な生物活性が、BDNF 挿入物を含有する pSG5 を用いてトランスフェクションした細胞の抽出物中に検出されたが、挿入物を含有しない pSG5 でトランスフェクションした細胞の抽出物では検出されなかった (図 8)。これらの結果は、クローニングされた遺伝子が生物学的に活性な BDNF を発現しうることを示す。

D. E. コリに於ける成熟ヒト BDNF の発現 図 1 に示されるヒト成熟 BDNF 遺伝子を E. コリ発現ベクターに挿入し、かかるベクターを E. コリ宿主細胞に導入し、そして下記実施例 2 記載の方法にしたがって、NGF 遺伝子に代えて BDNF 遺伝子を用いることによって、ヒト成熟 BDNF を生産する遺伝子の発現を達成する。

#### 実施例 1 の実験補遺

##### 1. 分子生物学の方法

実質的には Saiki ら、1988 Science 239: 487 の記載にしたがってポリメラーゼ・チェイン・リアクション (PCR) を行った。PCR 反応産物を 2% アガロースゲル

で電気泳動し、そして DNA (ザン) ブロッティングのために Zeta-Bind メンブラン (BioRad) 上に移した。適当な増幅バンドをもとのゲルから切り取り、DNA ポリメラーゼのクレノウフラグメント (New England Biolabs) を用いて末端を修復することにより、サブクローニング用に調製した。次に、平滑末端としてクローニングするか、またはプライマーに制限部位が入れてあれば適当な酵素で消化後にクローニングした。かかるフラグメントを、適当に切断しホスファターゼ処理した M13mp10 ベクター (Amersham) にサブクローニングした。キナーゼ処理によってオリゴヌクレオチドを放射性標識した (T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982))。オリゴヌクレオチドのハイブリッド形成条件は、6 X SSCP、2 X Denhardt's、2 mM EDTA、0.05% ビロリン酸ナトリウム、0.1% SDS、100 mcg/ml 酵母 tRNA (非特異的競合剤として)、pH 8.0 とした。ハイブリッド形成の温度、およびハイブリッド形成したプロットおよびフィルター洗浄の緊縮条件は、その相対的な GC 含量比に基づき各オリゴヌクレオチドプローブに応じて個々に調整された。長い放射性標識 DNA プローブをランダムプライミングにより調製した [A. P. Feinberg や B. Vogelstein, Anal. Biochem. 132, 6 (1983)]。かかるプローブを用いたハイブリッド形成条件は：65°C で、5 X SSCP、2 X Denhardt's、2 mM EDTA、0.05% ビロリン酸ナトリウム、0.1% SDS、250 μg/ml ニシン精子 DNA、pH 8.0 とし：0.1 X SSCP および 0.1% SDS 中 65°C で洗浄した。配列決定は M13 ベクターに於ける両方向のサブクローニングから調製された一本鎖 DNA を鏡型として用い、ジデオキシフェニルアミネーター法 [F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463 (1977)] によって行った。

実施例 2：E. コリに於ける組換え NGF の生産 成熟型の (プロセシングされた) ヒト NGF をコードする合成遺伝子を British Biotech から購入した。この遺伝子は様々な制限部位を挿入するために行われたヒト核酸配列内での変化以外は、NGF について報告されたヒト核酸配列 (Ullrich ら、1983 上記) と同一であり、これはプラスミド B B G 26 内で供給される。

【0101】このプラスミドで E. コリ DH 5 アルファ株を形質転換し、後続の操作に十分な量のプラスミドを生産した。適当な発現ベクターに挿入するためにこの合成遺伝子を修飾する目的で、以下の二つのオリゴヌクレオチドを合成した：

【0102】

BamHI 翻訳カッブラー  
 5'-GATC CGATCTGGAGGATGATCAA ATG TCC TCC TCC CAC CCG ATC  
 TTT CAC CGC GGC G-3'

5'-AAT TC GCC GCG GTG AAA GAT CGG GTG GGA GGA GGA CAT  
 TTATCA TCCTCCAAGATCG-3'

【0103】これらオリゴヌクレオチドは5'末端で1個のBamHI部位を、そして3'末端で1個のEcoRI部位を有する。この合成NGF遺伝子の5'末端付近に唯一のEcoRI部位が存在する。B BG 26を制限酵素EcoRIに接触させた後、この合成オリゴヌクレオチドをEcoRI部位のすぐ5'側で切断されたプラスミドと連結することができ、したがってNGFコード配列の5'部分を置き換えることができる。コード配列の5'末端をこのように置換することによって、上流の翻訳カッブラーの挿入が可能となり（上記オリゴヌクレオチド配列を参照）、またE.コリで好んで用いられるコドンの置換が可能となる（deBoerおよびKastelein From Genoto Protein: Steps Dictating the Maximal Level of Gene Expression (1986) DavisおよびReznikoff編, pp.225-283, Butterworths, NY）。これらの変化はNGF配列の効率的な発現を促進するために設計される。

【0104】オリゴヌクレオチドNGF-AおよびNGF-Bをキナーゼ処理し、ともにアニーリングした後、EcoRI切断されたホスファターゼ処理したプラスミドB BG 26に連結し、そしてこの混合物をホスファターゼ処理した。この混合物を制限酵素BamHIで処理し、修飾されたNGFコード配列を含有する約390bp BamHIフラグメントをゲル精製した。このフラグメントを、ゲル精製されBamHI切断そしてフォスファターゼ処理された二つの異なるE.コリ発現ベクターの各々に連結した、すなわち(1) pT5Tと呼ばれるT7ファージプロモーター系に基づくベクター；または(2) pT3XI-2と呼ばれる、トリプトファンおよびラクトースの両方で誘導されるハイブリッド「Tac」プロモーターに基づくベクター（詳細については本実施例の実験補遺および図4および図5参照）。この結果、pT5T:NGFまたはpT3XI-2:NGFのいずれかが生成した。

【0105】pT5T:NGFを用いてE.コリBL21 (DE3) 株を形質転換した。この菌株 (StudierおよびMoffat, J. Mol. Biol. (1986) 189: 113-130に記載) は、除去できない溶原ラムダバクテリオファージ上にIRTG誘導可能なlacプロモーターの制限下にあるT7RNAポリメラーゼ遺伝子を含有する。pT5Tベクター内の挿入物はT7ファージプロモーターの制御下にあるので、これは結局挿入配列の発現をlacプロモーターの制御下に置くことになり、したがって発現はイソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) によって誘導可能である。形質転換体を釣り上げ、

増殖させ、そして<sup>32</sup>P-標識390-bp BamHIフラグメントとハイブリッド形成させてどの形質転換体がNGF挿入物を担持するかを判定した。8個の陽性形質転換体が選択され、増殖させ、そしてベクターDNAを単離して配列決定した。8個の各々がベクター中に正しい挿入物を正しい方向で有していた。2個を別々に、1.5mcg/mlテトラサイクリン含有ルリアブロス中で光学濃度 (O.D.) 約0.6となるまで増殖させた後、培養物を最終濃度1 mMのIPTG添加によって誘導した。各培養物の試料を誘導後2時間から21時間まで一定間隔で採り、SDS-PAGE試料バッファー (0.025%プロモフェノールブルー、10%グルセロール、1%β-メルカプトエタノール、2%SDS、0.0625Mトリス-HCl、pH6.8) 中で溶解させた。各試料を還元型SDS-PAGEによって電気泳動し、そしてNGFの生成を正しい分子量位置にクマシーブリリアントブルー染色バンドが出現することおよびマウス頸下腺NGF (Sigma) に対する抗体を用いたウェスタンプロット分析の両者によってモニターした。陰性対照として、誘導しない同一培養物から、およびNGF挿入物を含有しないpT5Tベクターで形質転換した細菌の培養物から、試料を採取した。図2に示す結果は、形質転換体pT5T:NGF-18がプロセシングされたNGFに予想される分子量位置で抗-NGF抗血清によっても認識されるタンパク質バンドを生じることを示す（レーンの分類：pT5T:NGF-18 IPTGによる誘導2, 4, 8, 10, および21時間）。予想通り、NGF挿入物を含有しないpT5Tで形質転換された細菌（レーンの分類：pT5T\_u (非誘導) およびi (誘導)）、またはIPTGの存在による誘導を行わないpT5T:NGF-18（レーン分類：pT5T:NGF-18 IPTGによる誘導0時間）では、このバンドは検出されない。

【0106】pT3XI-2:NGFを用いてファージ-耐性E.コリK-株、JM107を形質転換した。13個の形質転換体をpT5T:NGF形質転換体と同様に増殖させそして3個がヒト成熟NGFタンパク質を発現することが、pT5T:NGF形質転換体に関して上記したと同様に、細胞抽出物のSDS-PAGEによりクマシーブリリアントブルー染色および抗-マウスNGF抗血清による免疫染色後に判明した。

【0107】E.コリJM107に於てpT3XI-2:NGFにより生産された組換えNGFのアミノ酸末端アミノ酸配列によって、アミノ末端メチオニンが生産され

たNGFの少なくとも85%で発現の間に除去されていたことが示された。これは、生産されたNGFが、プロセシングされた成熟ヒトNGFの正しいアミノ末端を有することを示している。

【0108】本文記載のようにして生産されたNGFが、下記実施例3記載の方法によって判定されるように、検出可能な生物活性を何ら有しないことが明らかとなった。ベクターpT5T: NGFまたはベクターpT3XI-2: NGFのいずれかによって生産されたタンパク質を神経成長刺激活性について調べ、そしてバキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞で生産された組換えh $\beta$ NGFを対照として用いた。陽性対照は1.1mg/mlの濃度で半-最大ニューロン生存を生じた。対照的に、E.コリでこれら二つのベクターから生産されたボ\*

*Clal*  
ATCGATGATA AGCTGTCAAA CATGAGAATT GAGCTCCCCG GAGATCCTTA  
GCGAAAGCTA AGGATTTTT TTAGATCT  
BgIII

【0110】2. pT3XI-2の説明:ハイブリッド「Tac」プロモーター系を用いたpKK223-3の修飾(このベクターの特徴については図5参照)この構築のための出発プラスミドはPharmaciaから購入したプラスミドpKK223-3であった。プラスミドpKK223-3はテトラサイクリン耐性遺伝子の一部を担持す※

5' GATCTAGAATTGTCATGTTGACAGCTTATCAT 3'  
3' ATCTTAACAGTACAAACTGTCGAATAGTAGC 5'

【0112】を有する合成アダプターおよびpBR322(PL Biochemicals, カタログ番号27-4891-01)のテトラサイクリン耐性遺伝子のClal, SphI消化物由来DNAの539塩基対フラグメントと混合した。生成するプラスミドをpCJ1と命名した。次に、New England Biolabsより入手したXhoIリンクーをプラスミドpCJ1のPvuI部位に挿入しプラスミドpCJX-1を作製した。この挿入によってプラスミドのコピー数を制御するr<sub>0</sub>p遺伝子が破壊される。lac1遺伝子を含有するEcoRIフラグメントをプラスミドpMC9 [Calosら, Proc.★

5' AATTCCGGGG TACCAAGATCT 3'  
3' GGGCCC ATGGTCTAGA 5'

【0116】かくして得られたプラスミドベクターをpCJX-1と呼んだ。最後にテトラサイクリン耐性遺伝子を、制限酵素HindIII, BamHIおよびSalI認識部位が亜硫酸水素塩変異誘発によって破壊された同様の遺伝子で置換した。次のような方法を用いてpBR322のテトラサイクリン耐性遺伝子を変異させた。プラスミドpBR322をHindIIIで切断し、次に亜硫酸水素ナトリウムで変異誘発した[ShortleおよびNathans, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1978) 5: 2170-2174]。変異誘発されたDNAを連結して環状DNAを形成させ、次にHindIIIで切断して変異誘発を受けなかったプラスミドをすべて線状とした。E.コリJM109 [Yanisch-Pe

\* リベプチドは約3,600mg/mlの濃度でもいずれも何ら有意な生物活性を示さなかった。

#### 実施例2の実験補遺

1. "T7プロモーター"系に基づく発現ベクター、pT5Tの説明(このベクターの特徴については図4参照)

T7プロモーターに基づく発現ベクターpT5Tは、実質的にはpJU1003と同一であるが[Squiresら, J. Biol. Chem. (1988) 263: 16297-16302]、ただしT7プロモーターの5'側の唯一のBglII部位とテトラサイクリン耐性遺伝子内のClal部位の間に短い一続きのDNAが存在する。このDNAの配列は以下の通りである:  
【0109】

10

【0111】

※る。この機能しない遺伝子を、プラスミドpBR322上に担持される完全なテトラサイクリン耐性遺伝子で置換した。プラスミドpKK223-3をSphIで完全に消化そしてBamHIで部分消化した。4.4キロ塩基対フラグメントをゲル精製そして以下の配列:

20

★Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1983), 80: 3015-3019]から精製した後、以下の配列を有するXhoI-EcoRIアダプターを用いてXhoI部位に挿入した:

30

【0113】

5' TCGAGTCTAGA 3'  
3' CAGATCTTAA 5'

【0114】次に、プラスミドpCJX-1のEcoRIおよびPstI部位間のポリリンクー配列を以下に示すポリリンクー配列で置き換えた:

35

【0115】

GAGCTCACTA GTCTGCA 3'  
CTCGAGTGTAT CAG 5'

40

ronら, Gene (1985) 33: 103-119]をこのプラスミドで形質転換した後、選択培地に塗布した。プラスミドをテトラサイクリン耐性コロニーから単離し、そしてテトラサイクリン耐性遺伝子内のHindIII部位の欠失に関して検査した。成功裡に変異したプラスミドをpT1と命名した。同様な方法によりpT1中のBamHI部位を変異誘発し、プラスミドpT2を生成させた。次にプラスミドpT2を変異誘発させて、SalI部位を除去してプラスミドpT3を作製した。変異テトラサイクリン耐性遺伝子を担持するpT3のClal/BsmIフラグメントを単離し、pCJX-1の相同フラグメントを置換するのに使い、pT3XI-2を作製した。変異したテトラサイ

50

41

クリン耐性遺伝子は機能するタンパク質を従前通りコードする。

3. pT3XI-2- $\phi$ 10TC3FGFsynの形成  
(NGFのためのtacプロモーターベクターの調製)

最初に、塩基性纖維芽細胞増殖因子(bFGF)の「遺伝子」を合成した。この「遺伝子」はSommerら(1987 Biochem. Biophys. Res. Commun. 141: 67)によって報告されたbFGFと同一の配列をコードするが、E. コリでよく発現される遺伝子に偏って見られるコドンを用い\*

AATTCAAGGA TCCGATCGTG GAGGATGATT AAATGGGTAC CATGGCTGCT GGCTCCATCA  
GTCCCT AGGCTAGCACT CGCTACTAA TTTACCCATG GTACCGACGA CCGAGGTAGT  
EcoRI BamHI RBS FGF 開始

翻訳カッブラー

CTACCCCTGCC GGCACGTGCCG GAAGACGGTC GCTCCGGTGC TTTCCCGCCG GGCCACTTCA  
GATGGGACGG CCGTGACGGC CTTCTGCCAC CGAGGCCACG AAAGGGCGGC CCGGTGAAGT

AAGACCCGAA ACGTCTGTAC TGAAAAAACG GTGGCTTCTT CCTGCGTATC CACCCGGATG  
TTCTGGGCTT TGCAGACATG ACATTTTTCG CACCGAAGAA GGACGCATAG CTGGGCCTAC

GTCGTGTGCGA CGGGGTACGT GAAAAAAAGCG ACCCGCACA TCAAATGCA GCTGCAGGCTG  
CAGCACAGCT TGCCGCATGC ACTTTTTTCC TGGGCGTGT AGTTTGACGT CGACGTCCGAC

AAGAACGTG GTGTTGTATC TATCAAAGGC GTTTGCGCAA ACCGTTACCT GGCTATGAAAG  
TTCTTGACAC CACAACATAG ATAGTTTCCG CAAACCGTT TGGCAATGGA CCGATACTTTC

AAGACGGTC GTCTGCTGGC TAGCAAATGT GTAACTGACG AATGTTTCTT CTTCGAACGTC  
TTCTGCCAG CAGACGACCG ATCGTTTACA CATTGACTGCA TTACAAGAA GAAGCTTGCAG

TGAAAGCA ACAACTACAA CACCTACCGT TCTCGTAAAT ACACCTCTTG GTACGGTGC  
ACCTTTCGT TGTGATGTT GTGGGATGGCA AGAGCATTAA TGTGAAGAAC CATGCAACGAG

TGAAACGTA CGGGCCAGTA CAAACTGGGT TCCAAAATG GCCCCGGTCA GAAAGCAATCC  
ACTTTGCAT GGCGGTCAT GTTGAACCCA AGGTTTGAC CGGGCCAGT CTTCGTTAGG

TGTTCCGTG CGATGAGCGC TAAATCTTAA ACTAGTA  
ACAAGGACG GCTACTCGCG ATTTAGAATT TGATCATTCGA  
FGF 終了 HindIII

[0119] 遺伝子の一部の特徴を強調している。次にこの遺伝子をBamHIおよびHindIII消化によって単離し、BamHI/HindIII-切断pJU1003 (Squiersら、1988、上記) に挿入してpJU1003-synFGFを生成させた。このプラスミドをXbaIおよびHindIIIで切断し、※

5' AAT TCC ACA ACG GTT TCC CT 3'  
GG TGT TGC CAA AGG GAG ATC 5'

新たに得られたプラスミドをpT3XI-2- $\phi$ 10TC3FGFsynと命名する。

4. TacプロモーターベクターへのNGF発現構築物の挿入

pT3XI-2- $\phi$ 10TC3FGFsynをBamHIで切断し、その結果7.4 kbpの発現ベクターが線状となり、約0.5 kbpのbFGF DNAフラグメントが放出された。修飾されたNGFコード配列を含有する390bp BamHI フラグメントを、ゲル精製したBamHI 切断ベクターDNAフラグメントに連結し、プラスミドpTX3I-2:NGFを生成させた。

実施例3: NGF/BDNF群メンバーの神経栄養性タンパク質の再生

\*る。この遺伝子の構造はそのコード部分の前に、翻訳の効率的な開始を保証するための翻訳カッブラー配列 (Squiresら、1988、上記、参照) がくるようになっている。

[0117] bFGF合成遺伝子をまずベクターM13mp 18のEcoRIとHindIII部位の間に挿入し、配列決定した。この遺伝子の構造は以下の通りである：

[0118]

※ bFGF遺伝子を担持するXbaI/HindIII フラグメントを単離した。このフラグメントを、下記のEcoRI-XbaIリンク用いて、EcoRIおよびHindIII切断pT3XI-2に連結した：

A. 真核細胞で生産されるかまたは天然起源から精製された成熟NGFの再生  
40 本発明の一実施態様は、細菌で生産された不活性で成熟型の組換えNGFを再生し、生物活性を回復させる能力に関する。これが可能であることを立証するために、真核細胞発現系で生産されるかまたは天然起源から精製された完全に生物学的に活性な成熟NGFが、変性およびジスルフィド結合の還元によってその生物活性が破壊された後で、うまく再生できるということをまず最初に確立した。この証明は二つの理由から重要である：

(1) 完全に変性させ還元した後で、細菌で生産された成熟NGF(もともと不活性)、または天然起源から精製された成熟NGF(もともと活性)が、不活性であり

そして構造的に区別できないことを提起することは合理的である。これらは構造的に区別できないので、真核細胞または天然起源由来の変性および還元された成熟NGFが成功裡に再生できることは、細菌から発現された成熟NGFをも変性および還元後にやはり成功裡に再生できることを示す。

【0120】(2) 完全な長さを有するNGF前駆体は細菌内で、真核細胞発現系に於けると同様にタンパク分解的にプロセシングを受けて正しい成熟NGFを生成させることができない。したがって細菌では成熟NGFのコード配列を直接発現させる必要があり、完全な長さの前駆体のコード配列を発現させる必要はない。成熟NGFが真核細胞および天然起源において生ずるような完全な長さの前駆体として最初に合成される場合にのみその正しい折りたたみを生じそして生物学的な活性を発揮するであろうことは理論的には可能である。このことは、細菌で生産された成熟タンパク質がうまく再生されるあらゆる可能性を排除するものであろう。しかしながら、変性および還元された成熟NGFが、ここで立証されたように成功裡に再生されることは、適正な再生が完全な長さの前駆体によって決まるのではないことを証明している。

【0121】2種類のもともとは生物学的に活性な成熟NGFを変性および還元後に再生することに成功した、すなわち(1)雄マウス頸下腺から精製された成熟(ペータ)NGF(SIGMA)および(2)欧州特許公告EP89113709号記載の方法にしたがって真核細胞で生産された組換えヒト成熟NGF。図3は、上記のように生産された組換えヒト成熟NGFがニワトリ胚交感神経節ニューロンの生存をNGFに予想される濃度で促進することを示す(Graeene 1977 Develop. Biol. 58: 96-113)。図3はまた、この生物活性が変性およびジスルフィド結合の還元後に失われることをも示している。図3はさらに、変性および還元されたタンパク質が本文記載の方法により再生された後、完全な生物活性を取り戻すことを示している。マウス頸下腺から精製された成熟 $\beta$ NGFを用いて実質的に同様の結果が得られた。これら再生の成功は、細菌で生産された成熟NGFの再生可能性を強く示している。

#### 【0122】1. NGF再生のプロトコル

NGFを0.5 mg/mlの濃度でPBS (0.15M NaCl, 0.04M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.2)に溶解し、塩酸グアニジンを最終濃度3Mとなるまで添加することにより変性させた。25°Cで30分後、ジオトレイトル(DTT)を最終濃度5.6 mMとなるまで添加し、そして25°Cでさらに2時間インキュベーションを続行した(50mM DTTもほぼ同様に良好な結果を伴って使用されている)。次に、酸化型グタチオンを最終濃度50mMとなるまで添加し、25°Cで10分間インキュベートした。この溶液をpH調整なしの、0.2%ヒト血清アルブミン含有0.6

%トリス(Boehringer/Mannheim 604-205)で7倍に希釈した。L-システィンを最終濃度20または30mMとなるまで添加して、同様の良好な結果を得た。この再生混合物を25°Cで16-20時間インキュベートした後、この物質をCentricon-10濃度装置(Amicon)を用いて濃縮し、バッファーをPBSと交換した。

【0123】2. 再生後のNGF生物活性のアッセイ  
未処理の出発NGF、3Mグアニジンおよび5.6mM DTT含有変性バッファー中に残るNGF、および変性させ

10 次に再生させたNGFを、本実施例の実験補遺に記載されるようにして、分離したE11ニワトリ胚交感神経節神経節由来のニューロンの生存を促進する能力についてアッセイした。図3はこのバイオアッセイの結果を示す。変性および還元されたNGFは450ng/mlで半最大生物活性を示したが、出発NGFおよび再生NGFはそれぞれ0.5および1.0 ng/mlで半最大生物活性を示した。これらの結果は、変性および化学的還元が組換えヒト成熟NGFの生物活性を約1,000倍低下させること、および再生過程により、バイオアッセイの実験誤差の約20 2倍以内で、出発NGFで見られた生物活性がこの物質に回復されることを示している。

B. E. コリ細胞で生産された成熟ヒトNGFの再生  
上記実施例2に記載のようにしてE. コリ細胞で発現された成熟NGFは生物学的に不活性である。以下に記載する方法にしたがって、かかるNGFを再生して生物学的に活性なNGFを生成させる。

#### 【0124】1. 再生のための出発物質の調製

実施例2記載のJM107中のpT3X1-2:NGF由来のE. コリ細胞ペースト10gを、10mM EDTA, pH

30 7.0, 50ml中に再懸濁しそして16,000psiで2回フレンチプレスにかけた。細胞抽出物を16,000×gで20分間遠心沈殿させ、上清を捨てた。ペレットを10mM EDTA, pH7.0, 100mMでホモジナイズした。再懸濁したペレットを上記のように遠心分離して上清を捨てた。このペレットを再度pH7.0の10mM EDTA, 100ml中でホモジナイズした。再懸濁したペレットを上記のように遠心分離して上清を捨てた。このペレットを50mlトリス中の4M尿素、pH8.0, 30mlおよび0.2% $\beta$ -メルカプトエタノールでホモジナイズした。上記のように、再懸濁したペレットを遠心分離し上清を捨てた。ペレットを8M尿素を含有する20mMクエン酸ナトリウム、pH3.0の30mlでホモジナイズした。再懸濁したペレットを上記のように遠心分離し、上清を氷上に置いた。ペレットを8M尿素を含有する20mMクエン酸ナトリウム、pH3.0の30ml中でホモジナイズし、上記のように遠心分離し、上清を氷上に置いた。この上清は-80°Cで保存できる。

#### 【0125】2. E. コリ抽出物の再生

上記の最終上清抽出物に、4分の1量の8M尿素含有1Mトリス、pH8.5を添加した。ジオトレイトルを最終濃度5-15mMとなるまで添加し、その溶液を25°Cで15

時間放置した。次に、シスチン（または酸化型グルタチオン）を最終濃度15-50mMとなるまで添加し、この溶液を25°Cで10-15分放置した。9容の3.2-4.2M尿素含有100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を添加した後、シスチン（またはグルタチオン）の最終濃度の2-3倍のシステインを加えた。この溶液を一晩4°Cに保持した。これらの条件は活性NGFを還元も変性もさせない。

【0126】前記条件は許容できることが判明した濃度範囲および代替試薬を提供する。以下は代表的な再生実験の一例を示す：40mlの上記E.コリ抽出物（クマシーブリリアントブルー染色したSDS-ポリアクリラミドゲルのレーザーデンシティメトリーによる測定で、約650μg/mlのNGFを含有する）に10mlの8mM尿素含有1Mトリス、pH8.5を加えた。2mlの400mMジチオトレイトールを添加そしてこの溶液を25°Cで1時間放置した。4mlの600mM酸化型グルタチオンを添加し、この溶液を25°Cで15分間放置し、この時点で450mlの3.2M尿素含有100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH8.3を添加し、続いて6mlの1Mシステインを添加した。この溶液を4°Cで16時間放置した。この溶液は以下で最終再生混合物と呼ぶ。

#### 2a. E.コリで生産された成熟ヒトNGFの抽出および再生に関する別法

以下の方法がすでに提示された方法よりも好ましい、なぜなら結果的に再生の効率および速度が有意に高く、また正しく再生された生物学的に活性な成熟ヒトNGFをより高収率で生ずるためである。

#### NGF抽出

NGFを生産するE.コリ細胞（実施例2に記載）を10容量/重量（例えば1リッター/100g細胞ペースト）の10mM EDTA、pH7.0中で、フレンチプレスまたはゴーリンミルによって破壊した。溶解物を16,000×gで20分間遠心分離してペレットから上清を分離した。このペレットを10倍容の10mM EDTA、pH7.0中でホモナイズし、上記のように遠心することによってさらに2回再抽出した。そのペレットをもう一度上記のように抽出した。洗浄されたペレットを5容量/重量の2M尿素含有20mMトリス、pH8.0で抽出そして上記のように遠心した。上清を捨てた。

【0127】このペレットから、10容量/重量の8M尿素含有20mMクエン酸塩、pH3.0を用いてNGFを抽出して上記のように遠心した。ペレットを最後に4容量/重量の8M尿素含有20mMクエン酸塩、pH3.0で上記のように再抽出する間に、上清を氷上に保持した。このCU（クエン酸尿素）抽出物中におけるNGFは総タンパク質の約50%であった。

【0128】代表的な再生は以下のように行われた：20mlの8M尿素含有1Mトリス、pH8.5を、約2mg/mlのNGFを含有するCU抽出物80mlに添加した。ジチオトレイトールまたはβ-メルカブトエタノールを最終濃度5mMとなるまで添加し、この混合物を30-60分間25°C

に保持した。次に酸化型グルタチオンまたはシスチンを最終濃度20mMとなるまで添加し、反応混合物を10-15分間25°Cに保持した。次に、19容の希釈バッファー（100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、10mMエタノールアミン、pH8.3、4.6M尿素、および15.8%ポリエチレングリコール300）を添加した。シスチンまたは2-メルカブトエチルアミンを最終濃度3mMとなるまで添加した。3-5サイクルの脱気およびアルゴンバージにより、最終的な再生混合物を真空下で脱気そして精製アルゴンでバージした。この混合物をガスが侵入しないようにシールし、アルゴン下9°Cで1-7日間保持した。

【0129】最終再生混合物中におけるシステイン（または2-メルカブトエチルアミン）対酸化型グルタチオン（またはシタミン）の比率を最適にすることが賢明である。最適比率（代表的には2-10の間）は、最終反応混合物を保持する温度を包含するいくつかの要因の如何に応じて変動し得る。0-25°Cの温度で再生NGFが生じる；しかしながら、好ましい温度は4-9°Cの間である。希釈工程では3xから80xの最終希釈度でNGFを生じる；しかしながら、20xまたはそれ以上の希釈度が再生される総NGFの%が最も高くなる。ポリエチレングリコール200、300および1000が25%までの最終濃度で使用される場合に再生NGFを生じる；しかしながら、ポリエチレングリコール200または300を15%の最終濃度で用いる場合の収率の方がより高い。エチレングリコール、グリセロール、プロピレングリコールをポリエチレングリコールの代わりに使用できる；しかしながら、再生効率はポリエチレングリコール300と比べておよそ3分の2に低下する。最終再生混合物中の尿素濃度は4から6Mの間をとることができるが、4.5-6.0Mで最高収率の再生NGFを生ずる。再生混合物におけるpHが8から10までの範囲で再生が起こるが、pH10が最も速い再生を生ずる。最終再生混合物中のリン酸バッファー濃度は、1.00から3.00mMの間で最低に維持され、この間リン酸塩バッファー対エタノールアミンの比は10:1に維持される。

【0130】上記のようにして行われた再生の結果、代表的には当初量の約30%以上のNGFが正しく再生された生物活性型を生じた。E.コリから抽出されたNGFを上記のように尿素およびメルカブトエタノール中で変性および還元し、次にRP-HPLC（約43%アセトニトリルで单一ピークとして出現）で精製する場合再生効率は出発NGFの60%以上に増加する。このことは、E.コリ抽出物中の混入物が、部分的に再生効率を妨げることを示している。例えばイオン交換クロマトグラフィーのようなRP-HPLC以外の方法による再生に先立ちNGFの精製を行う場合も再生効率を高めることができる。

#### 3. 再生効率の測定

最終再生混合物中のNGFの総量を以下のように測定し

た：還元条件下で泳動した SDS-ポリアクリルアミドゲルをクマシーブリリアントブルーで染色後、レーザーデンシトメトリー検査を行った。このゲルに於て、一部のレーンは NGF 目盛り用標準物質（実施例 3 で述べるパキュロウイルス、昆虫細胞-産物）を様々な濃度で含有し、一方、他の一部のレーンは最終再生混合物の一定部分を含有した。レーザーデンシトメトリーの光学濃度と NGF 標準タンパク質量との間に定量的な関係を確立することによって、未知試料中の NGF 量を測定できる。

【0131】最終再生混合物中で正しく再生された NGF 量は以下のようにして測定した：最終再生混合物の連続希釈物を実施例 3 の実験補遺に記載のアッセイで、インピトロでニワトリ胚交感神経鎮ニューロンの生存促進能について検査した。同じアッセイである濃度範囲の標準昆虫細胞生産 NGF もニューロン生存促進能について検査した。バイオアッセイで半最大生存を生ずる最終再生混合物の希釈度を半最大生存を生ずるのに必要な標準 NGF と同一濃度の正しく再生された NGF を含有するところをみた。

【0132】これらの方法を用いて、上記の実験的な再生で正しく再生された NGF 量を測定した。バイオアッセイに於ては、半最大生存を生ずるのに 3.7 ng/ml の昆虫細胞生産 NGF が必要であった。1:1500 の希釈度の最終再生混合物が半最大生存を生じたことから、その最終再生混合物は  $(1500 \times 3.7) = 5550$  ng/ml の活性 NGF を含有すると結論された。最終再生混合物中の NGF の総量はレーザーデンシトメトリーによって 52000 ng/ml と概算され、このことは約 11% の再生効率を示している。

【0133】図 9 は標準昆虫細胞生産 NGF のバイオアッセイ結果を示し、この NGF は 3.7 ng/ml で半最大生存を生じた。図 10 は最終再生混合物のバイオアッセイ結果を示し、この試料は 1:1500 の希釈度で半最大生存を生じた。

4. E. コリで生産された再生 NGF の精製および特性決定  
逆相高性能液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を用いて、最終再生混合物中の生物学的に活性な再生 NGF の精製および特性決定を行った。RP-HPLC 条件は以下の通りであった、すなわち溶媒 A = 水中 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA)；溶媒 B = アセトニトリル中 0.1% TFA (すべて HPLC 等級試薬)；カラム = Vydec C4 #214TP54；流量 = 每分 1 ml。試料は時間 0 で注入しそして以下のプログラムで濃度勾配を展開した：

時間	% B
0	5%
5-10	5-20%
10-40	20-50%
40-50	50-80%

引き続いて再生試料を分析するためにカラムの目盛りづけをする目的で、天然に存在する NGF および還元 NGF の位置を決定した。% B は、カラム溶離剤中の溶媒 B 量である。昆虫細胞により生産された天然型 NGF の試料は約 34% B で溶出した。変性され還元された昆虫細胞生産 NGF の試料は約 43% B で溶出した。この NGF は、200 mM トリス、pH 8.5 中の 6 M 塩酸グアニジンおよび 50 mM シチオトリエートールに曝すことによって変性および還元された。個々の RP-HPLC カラムは、これら二つの試料が溶出する正確な % B を決定するために、これら標準物質を用いた別々の目盛りを要した。

【0134】上記再生実験から得られた最終再生混合物 50 μl において、天然 NGF の位置でタンパク質ピークが出現した (図 11B)。再生前には、この位置にタンパク質は全く溶出しなかった。100 ng の天然型昆虫細胞生産 NGF を別の 50 μl 試料に添加した場合、この位置の NGF ピークの大きさは約二倍となった (図 11A)。このことにより、再生後に出現するタンパク質は天然型 NGF と同じ位置で溶出することが確認され、また 50 μl の最終再生混合物中にこの物質が約 100 ng 存在することも示された。交感神経ニューロン生存アッセイに於て、RP-HPLC 濃度勾配から収集したフラクションの生物活性をアッセイした場合、このピークだけが検出可能な生物活性を示した。このことにより、最終再生混合物中におけるこのタンパク質の NGF としての同一性がさらに確認される。このピークの比活性は、天然型混合細胞生産 NGF で観察されたその範囲内であった (別の日に行われた別々のアッセイに於て、半最大生存 0.5 - 5 ng/ml)。このように、E. コリ由来の再生 NGF は天然型昆虫細胞生産 NGF の位置で溶出し、完全に生物学的に活性である。

【0135】再生が上記実施例 3. B. 2 a. におけるようにして行われる場合は、再生 NGF の精製を以下のようにして行うことができる。最終再生混合物を、例えば中空纖維フィルター/濃縮器のような濃縮装置を用いて約 20 倍に濃縮する。次にこの濃縮物を 10-20 倍容の尿素含有バッファーで透析する。使用するバッファーは 50 mM 酪酸ナトリウム、pH 5.0 であり、これは再生 NGF がこのバッファー中に可溶せでかつこのバッファー中に安定であり、そしてその pH が後続の陽イオン交換クロマトグラフィーに適しているためである。透析バッファーは、透析後の最終尿素濃度が 1.5-2 M となるに十分な尿素を包含する。これによって、逆相 HPLC により判定されるように、E. コリタンパク質および正しく再生されなかった NGF を沈殿させることができるとなる。

【0136】透析した試料を遠心して沈殿をベレットとし、次に50mM酢酸ナトリウム、pH5.0中のS-セファロースにかける。このカラムを洗浄し、0.05-1.5M NaClの直線塩濃度勾配を用いて溶出させる。NGFは逆相HPLCによって均質となるまで精製させる。図12は最終再生混合物の逆相HPLC (RP-HPLC) タンパク質プロフィールを示す。正しく再生されたNGFが主要なタンパク質ピークであり、約37%アセトニトリルで溶出する。図13は、濃縮および透析後ではあるがS-セファロースでのクロマトグラフィー前の最終再生混合物のRP-HPLC タンパク質プロフィールを示す。約47%アセトニトリルで溶出する(図12)再生されないNGFを包含する、図12で見られる他のタンパク質の混入が有意に減少しそして正しく再生されたNGFは実質的に純粋である。図14は、S-セファロースでのクロマトグラフィー後の試料のRP-HPLC タンパク質プロフィールを示す。ほとんどすべての混入タンパク質が除去されている。再生NGFの主要ピークのすぐ後に溶出する小ピークは、再生されたNGFの単量体である。約37%アセトニトリルで溶出する主要ピークは再生NGFの二量体である。

【0137】逆相-精製されたNGFのニワトリ胚交感神経細胞生存バイオアッセイに於ける比活性は、E.D.<sub>50</sub> = 0.17 ± 0.01ng/mlであった。比較すると、昆虫細胞で生産されたヒト組換えNGF(実施例3記載)の比活性は、E.D.<sub>50</sub> = 0.26 ± 0.02ng/mlであった。このことは、E.コリで生産され、ここで記載される方法によって再生および精製された再生NGFが完全に生物学的に活性であることを証明している。

#### 【0138】C. 成熟ヒトBDNFの再生

上記実施例1Dに記載されるようにして、E.コリで生産された組換え成熟ヒトBDNFを、上記実施例3B記載の方法にしたがって再生することにより生物学的に活性なものにする。

#### D. 成熟NGF-3の再生

下記実施例4記載のような成熟ヒトNGF-3を、上記実施例3B記載の方法にしたがって再生することにより生物学的に活性となす。

#### 実施例3の実験補遺

##### 1. NGFおよびBDNFのバイオアッセイ

ニワトリ胚交感神経節および後根神経節の培養物を前記のようにして調製した(CollinsおよびLile 1989 Brain Research 502: 99)。簡単に説明すると、交感神経または後根神経節を、加湿環境中、38°Cで8-11日間インキュベートされた、病原体に汚染されていない受精卵から取り出した。その神経節を、最初に10mM HEPESバッファー pH7.2を含有し2価カチオンを含有しないハンクス平衡塩類溶液に37°Cで10分間曝し、次に上記のように改変されたハンクス平衡塩類溶液中 0.125%バクトリプシン1:250 (Difco, Detroit, Michigan)の溶液

に37°Cで12分間曝すことによって化学的に解離させた。ウシ胎児血清を最終濃度10%となるまで添加することによってトリプシン処理を停止させた。この処理後、神経節を、10%ウシ胎児血清および10mM HEPES, pH7.2を含有し炭酸水素塩を含有しないダルベッコ高グルコース改変イーグル培地からなる溶液に移し、約10回ガラス製バストゥールビベットを通して粉碎することにより機械的に解離させた。このバストゥールビベットの開口部は予め口焼きされ、そのビベットを満たすのに2秒かかるように直径にそばめられている。次に、解離した神経節を100mm 直径の組織培養皿内の培養培地(10%ウシ胎児血清、4mMグルタミン、60mg/1ペニシリン-G、25mM HEPES, pH7.2を添加したダルベッコ改変イーグル培地)に塗布して3時間おいた(培養皿当たり解離神経節40)。皿に付着する非ニューロン細胞を付着しない神経細胞から分離するために、このようにプレ塗布を行った。3時間後、付着しない神経細胞を遠心によって収集し、培養培地に再懸濁し、96ウェルミクロタイヤー組織培養プレートの半分の領域に、ウェル当たり1500個の神経細胞の密度で、ウェル当たり50μlとして塗布した。塗布の前に、そのミクロタイヤーウェルは10mMホウ酸ナトリウム、pH8.4に溶解したボリーレーオルニチンの1mg/ml溶液に4°Cで一晩曝し、蒸留水で洗浄しそして風乾しておいた。

【0139】神経栄養活性に関してアッセイすべき試料の連続希釈物10μlを各ウェルに添加し、その皿を7.5%CO<sub>2</sub>含有加湿環境下37°Cで20時間インキュベートした。18時間後、10mM HEPES, pH7.2を含有し炭酸水素塩を含まないダッベッコ高グルコース改変イーグル培地中のテトラゾリウム色素MTTの1.5mg/ml溶液を、ウェル当たり15μl添加し、培養物を37°Cのインキュベーターに戻して4時間置いた。次に、6.7mlの12M HClを1リッターのイソプロパノールに溶解した溶液75μlを添加し、そして各ウェルの内容物を30回ビベットを通して粉碎して細胞を破壊し、色素を懸濁させた。自動ミクロタイヤーリーダー(Dynatech, Chantilly, Virginia)を用いて、570nmでの吸光度を各ウェルに関する690nmの標準値と比較して測定した。何ら神経栄養性物質を加えなかったウェルの吸光度(陰性対照)を試料含有ウェルの吸光度から引算した。得られた吸光度は、各ウェル内に生存する細胞数と比較し、そして色素還元能を有する神経細胞として定義される。ml当たりの栄養ユニット(TU)で表される栄養活性の濃度は、神経細胞の最大生存の50%を生ずる希釈度と定義された。例えば、1:100,000希釈した場合に試料が50%最大生存を生ずる場合、その力値は100,000TU/mlと定義された。比活性は、ml当たりの栄養ユニット数を未希釈試料のml当たりのタンパク質濃度で割ることによって決定された。

実施例4: NGF/BDNF群の神経栄養性タンパク質の新規メンバー、NGF-3のクローニング

51

A. NGF-3のDNAフラグメントを増幅するためのポリメラーゼ・チェイン・リアクション(PCR)の利用  
種々の種の成熟(プロセシングされた)NGFおよびBDNFおよびヒトのBDNFをコードする核酸配列の高度に保存された領域に基づいて、二つの部分的に縮短したオ\*

52

\*リゴヌクレオチド、NNF-1およびNNF-3を合成した。これらをスクレオチドの配列、および増幅フラグメントのサブクローニングを容易にするために挿入された5'制限部位を以下に示す。(I=イノシン)  
【0140】

## NNF-1 (センス ストランド)

HindIII  
5'- GGAAGCTT GTG TG(C/T) GAC AG(C/T) (A/G)T(C/T) AG(C/T)  
(A/G) (A/T)G TGG GT -3'

## NNF-3 (アンチセンス ストランド)

BamHI  
5'- CCGGATCC TTC CA(A/G) TG(C/T) (C/T)T I (A/G) (A/C) (A/G)  
TC I AT(G/C) CC(C/T) C(G/T)G CA-3'

【0141】 NNF-1およびNNF-3をPCR(実施例1の実験補遺参照)のプライマーとして用い、ヒトゲノムDNAを錠型とした。PCR産物を3%アガロースゲルで電気泳動し、そして予想される大きさの150-200bp付近の蛍光DNAバンドをゲルから切り出し、平滑末端連結によってSmaI-切断ファージM13mp10にクローニングした。生成する連結反応液をE.コリT G1株上に塗布し、2連のリフトをとった。第一のリフトは、PCRによって得られたランダムに標識したヒトBDNFコード配列と高い緊縮条件下でハイブリッド形成した(実施例1参照)。第二のリフトは、British Biotechから入手したランダムに標識したヒトNGF成熟タンパク質コード配列と高い緊縮条件下でハイブリッド形成した(実施例1参照)。いずれか一方のプローブとハイブリッド形成したブラークは、それ以上追跡しなかった。ベーターガラクトシダーゼを生産できないことによって示される、挿入物を含有する残りすべてのブラークを配列決定した。かかるブラークの一つ内のファージ、NNF-18.は136bpの増幅されたDNAフラグメントをオリゴヌクレオチドNNF-1およびNNF-3の間に含有し、このフラグメントはヒトNGFと53%等しく、ヒトBDNFと44%同一なタンパク質フラグメントをコードしていた(図7)。アミノ酸相同性の一部はNGFおよびBDNFの双方に対するものであり、また一部はNGFまたはBDNFの一方に対する相同性である(図7)。NGF-3フラグメントは、NGFおよびBDNFの二つが相互に担持するのとほぼ等しい相同性をNGFまたはBDNFに対して有する(図7)。図6で、このフラグメントのDNA配列に下線を付し、ここでNGFおよびBDNFと比較する。これらの相同性に基づけば、このフラグメントはNGF/BDNF群の神経栄養性タンパク質の新規メンバーの遺伝子から増幅されたと

結論された。この新規遺伝子およびタンパク質をNGF-3と命名した。

【0142】 B. NGF-3のヒト遺伝子をクローニングするためのPCR増幅DNAの利用

上記のようにしてPCRによって増幅されたNGF-3のDNAフラグメントを、<sup>32</sup>P-dCTPの存在下PCR増幅を行うことにより放射性標識し、そしてこれを用いてラムダF I XIIのヒトゲノムライブラー( Stratagene カタログno. 946203)をスクリーニングした。クローニングを繰り返すことによって、 $1.2 \times 10^6$ 個のブラークから6個の陽性クローンを精製した。制限酵素HincIIを用いた、一陽性クローン由来のDNAの部分消化物をベクターM13にサブクローニングした。放射性標識PCRフラグメントとハイブリッド形成した数個のM13サブクローンを上記実施例1 B記載の方法にしたがって両方向から配列決定して、ヒトNGF-3の完全な核酸配列(図6)および推定アミノ酸配列(図7)を得た。

【0143】

C. E. コリでの成熟ヒトNGF-3の発現

上記実施例4 B記載のようにして得られたヒト成熟NGF-3遺伝子をE.コリ発現ベクターに挿入し、そのベクターをE.コリ宿主細胞に導入そして上記実施例2記載の方法に従い、NGF-3遺伝子をNGF遺伝子に代えて用いることにより遺伝子を発現させて成熟NGF-3を生産させる。次に、組換え発現タンパク質を上記実施例3 B記載の方法にしたがって再生することにより生物学的に活性となす。

【0144】 上記説明および実施例は本発明およびその好ましい実施態様を説明するために示す。本文記載の方法の多數の改変は当業者に明白であって下記請求の範囲内にある。

50 【図面の簡単な説明】

【図1】ヒトBDNFの核酸および推定アミノ酸配列を示す。成熟(プロセッシングを受けた)形BDNFの推定アミノ酸配列を太字で示す。

【図2】ベクターpT5Tを用いたE.coliにおけるヒト成熟(プロセッシングを受けた)NGFの発現を示す。

【図3】真核細胞により生産された成熟ヒトNGFの変性および再生の際の、それぞれの生物学的活性の低下および回復を示す。

【図4】細菌発現ベクターpT5Tのいくつかの特徴を示す。

【図5】細菌発現ベクターpT3XI-2のいくつかの特徴を示す。

【図6】NGF-3の核酸配列とNGFおよびBDNFの配列とを比較して示す。

【図7】NGF-3のアミノ酸配列をNGFおよびBDNFの配列と比較して示す。

【図8】ヒトBDNF挿入物を含むかまたは含まないプラスミドpSG5でトランスフェクトされたCOS-7細胞の抽出物、E10ニワトリ背根神経節ニューロンを使ったバイオアッセイを示す。

【図9】E10ニワトリ胚交感神経節ニューロンに対するバイオアッセイを用いた、昆虫細胞により生産されたヒト組み換えNGFの用量-応答曲線を示す。

【図10】E10ニワトリ胚交感神経節ニューロンに対するバイオアッセイを用いた、E.coliにより生産されたヒト組み換えNGFの最終再生混合物の連続希釈物の生物学的活性を示す。

【図11】(A) 100ngの天然の、昆虫細胞により生産されたNGFを加えた図10でアッセイした最終再生混合物50μl:および(B)天然の、昆虫細胞により生産されたNGFを加えなかった最終再生混合物50μl:の逆相

10高性能液体クロマトグラフィーによる分析を示す。

【図12】精製前の最終再生混合物を逆相HPLCによりC4カラムでクロマトグラフィーにかけた場合の蛋白の溶離プロファイル(214nmでの光学濃度)を示す。

【図13】透析および濃縮後であるがS-セファロース前の最終再生濃度を逆相HPLCによりC4カラムでクロマトグラフィーにかけた場合の蛋白の溶離プロファイル(214nmでの光学濃度)を示す。

【図14】S-セファロースで精製後の最終再生混合物を逆相HPLCによりC4カラムでクロマトグラフィーにかけた場合の蛋白の溶離プロファイル(214nmでの光学濃度)を示す。

20

【図1】

### ヒトBDNFの核酸配列およびアミノ酸配列

(成熟プロセッシング済みタンパク質の推定配列を太字で示す)

```

ATG ACC ATC CTT TTC CTT ACT ATG GTT ATT TCA TAC TTT GGT TGC ATG AAG GCT GCC
M T I L F L T M V I S Y F G C M K A A
CCC ATG AAA GAA GCA AAC ATC CGG GGA CAA GGT GGC TTG GCC TAC CCA GGT GTG CGG
P M K E A N I R G Q G G L A Y P G V R

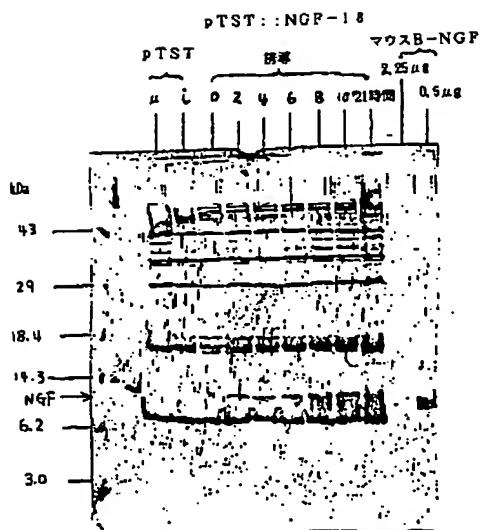
ACC CAT GGG ACT CTG GAG AGC GTG AAT GCG CCC AAG GCA CGT TCA AGA GGC TTG ACA
T H G T L E S V N G P K A G S R G L T
TCA TTG GCT GAC ACT TTC GAA CAC GTG ATA GAA GAG CTG TTG GAT CAG GAC CAG AAA
S L A D T F E H V I E E L L D E D Q K
GTT CGG CCC AAT GAA GAA AAC AAT AAG GAC GCA GAC TTG TAC ACG TCC AGG GTG ATG
V R P N E E N N K D A D L Y T S R V M

CTC AGT AGT CAA GTG CCT TTG GAG CCT CCT CTT CTC TTT CTG CTG GAG GAA TAC AAA
L S S Q V P L E P P L L F L L E E Y K
AAT TAC CTA GAT GCT GCA AAC ATG TCC ATG AGG GTC CGG CGC CAC TCT GAC CCT GCC
N Y L D A A N M S M R V R R H S D P A
CGC CGA GGG GAG CTG AGC GTG TGT GAC AGT ATT AGT GAG TGG GTA ACG GCG GCA GAC
R R G E L S V C D S I S E W V T A A D
AAA AAG ACT GCA GTG GAC ATG TCG GGC GGG ACG GTC ACA GTC CTT GAA AAG GTC CCT
K K T A V D M S G G T V T V L E R V P
GTA TCA AAA GGC CAA CTG AAG CAA TAC TTC TAC GAG ACC AAG TGC AAT CCC ATG GGT
V S K G Q L K Q Y F Y E T K C N P M G
TAC ACA AAA GAA GGC TGC AGG GGC ATA GAC AAA AGC CAT TGG AAC TCC CAG TGC CGA
Y T K E G C R G I D K R H W N S Q C R
ACT ACC CAG TCG TAC GTG CGG CCC CTT ACC ATG GAT AGC AGA AAG AGA ATT GGC TGG
T T Q S Y V R A L T M D S R X R I G W
CGA TTC ATA AGG ATA GAC ACT TCT TGT GTA TGT ACA TTG ACC ATT AAA AGG GGA AGA
R F I R I D T S C V C T L T I K R G R
TAG

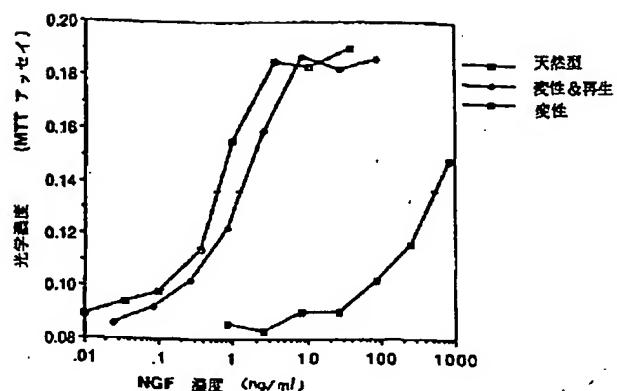
```

終止

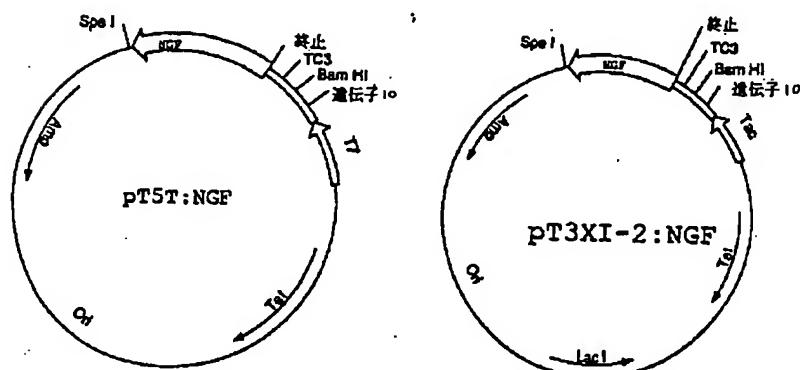
【図2】



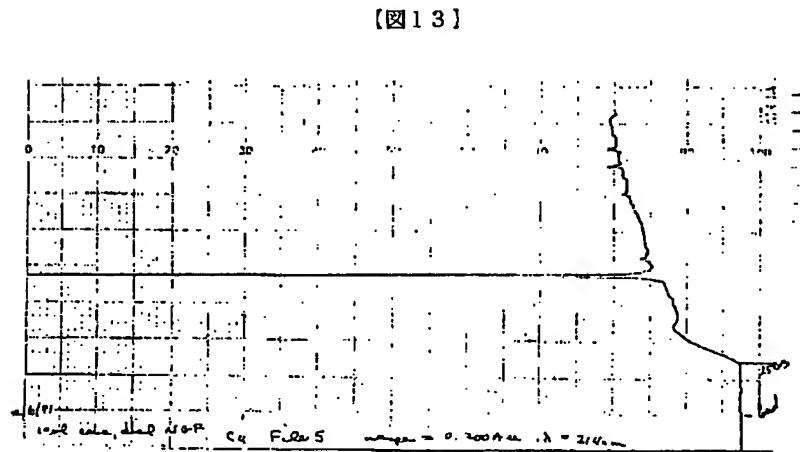
【図3】



【図4】



【図5】

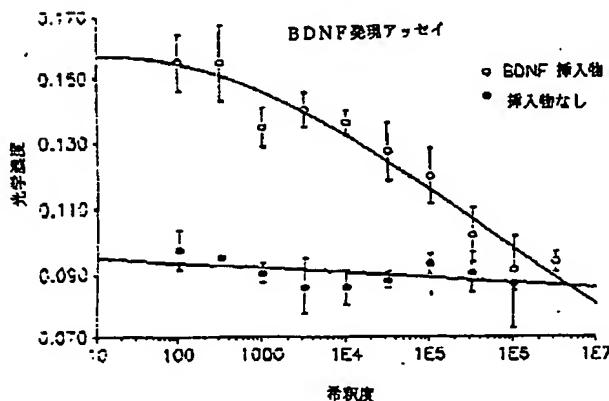


【図6】

## ヒトNGFおよびBDNFと比較したヒトNGF-3の核酸配列

bdnf ATG CATCCTTCTTACTATGCTTATTCATACTTGGTGCATGAAGGCTGCCCATGAAAAGA  
 nglf-3 ATGTCATCTGTTATGCTATCTCGCTATCTCGGCATCCAAAGTAACAAACATGGATCA  
 nglf ATGTCATCTGTTCTACACTCTGATCACAGCTTCTGATGGCATACAGGGACCACACTCAGA  
  
 ACCAAACATCCGGAGGACAAGCT-----CGCTTGGCCTACCCAGGTGTCGGG---ACC-----CATGGGACTCT  
 AAGGAGTTGGCAGAAGACTCGCTCAATTCCTCATTATTAAAGCTGATCCAGGAGATATTGAAAACAAAGCT  
 GAGCAATGTCCTGCA---GGA---CAC-----ACCATCCCCAACGTCCTACTGGACTAAACTTCAGCATTCCCT  
  
 CGCAGC-----GTGAATGGGCCAACGGCAGGTTAACAGGCTTACATGACATTGGCTGACACTTTCGACACGCT  
 CTCCAAGCAGATGGGACGTTAAGGAAAATTACCAAGRCACCCCTGCCAAAGCTGAGGCTCCCCGAGAGCCCGA  
 TGAC-----ACTGCC---CTTCGAGGCC---CGCAGC---GCAGCGGCGATAGCTGACCGGT  
  
 GATAGAAGAGCTTGGATGAGGAC---CAGAAAGTCCGGCCAATGAAGAAAAC-----ATAAGGACGAGA  
 GCGGGGAGGGCCCGCAAGTCAGCATCCAGCCAGTGGCAATGGACACCGAACTGCTGCGACACAGACG  
 GCGGGG---CAGACCCG---AACATT---ACTGTG-----GACCCAGGCTGTTT---AAAAAGCGGG  
  
 CTTGTACACCTCCAGGCTGATGCTCACTAGTCAGTCCTTGGACCCCTCCCTCTCTCTCTGCTGCCAGGAATA  
 CTACAACCTACCCGGGCTCTGCTGAGGGACAGCACCCCTTGGAGCCCCCGCCCTGATCTCATGGAGGATT  
 ACTCCGTCACCCCGTGTGCTGTTAGCACCAGCTCCCGTGAAGCTGAGACACTCAGGATCTGGACTTCGA  
  
 CAAAATACCTAGATGTCGAAACATGTCATGAGGGTCCGGCGC-----CACTCTGACCCCTGCCCGCCCG  
 CGTGGGCACCCCGGTGGCAGAACATCAGGGAAACAGG---TACGGGAGGATAAGAGTCACCCGAG  
 GGTGGTGGTGTGCTGCCCTTCAACAGGACTCACAGGAGCAAGGGTCACTCCCATCCCCATCTCCACAGGG  
  
 GGAGCTGAGCGTGTGACAGTATTAGTGAGTGGCTAACGGGGCAGACAAAAGACTGCACTGGACATGTCGG  
 GGAGTACTCGGTATGTGACAGTGAGACTGTGGGTGAC-----GACAAGTCATGGCCATCGACATTGCG  
 CGAATTCTCGGTGTGCACTGTCAGCGTGTGGGGGG-----GATAAGACCACCCGACAGACATCAAGGG  
  
 CGGGACGGTCACACTCTGAAAGGCTCTGATCAAAGGCCAACTCAAGGAAACTCTACGGAGACCAACTG  
 ACACCAAGGTCACGGTGTGGGGAGATCAAACGGGAAACTCTCCGTCAAACAAATATTTTATGAAACGGGATG  
 CAAGGAGGTGATGGTGTGGAGGGTGAACATTAACACACTGTATTCAAACAGTACTTTTGAGACCAAGTG  
  
 CAATCCCATGGGTACACAAAAGGCTGCAGGGCATAGACAAAAGGCACTGGAACTCCAGTGGCAACTAC  
 TAAGGAAGCCAGCCGGTCAAACGGCTGGAGGGTATTGATGATAAAACACTGGAACTCTCAGTGCACAAACATC  
 CGGGACCCAAATCCCGTGTGACAGCGGGGGCATTGACTCAAAGCACTGGAACTCATATTGATACCGAC  
  
 CCAGTCGTACGTGCGGGCTTACCATGGATAGCAGAAAGAGAATTGGCTGCCGATTCTATAAGGATACACACTC  
 CCAACACCTACGTCGAGGACTGACTTCAGAGAACATAAAACTCGTGGCTGGGGTGACATGGATACGACACCTC  
 TCACACCTTGTCAAGGGCTGACCATGGATGGC---AAGCAGGCTGCCCTGGGGTTATCCGGATAGATAACGGC  
  
 TTGTGTATGTACATTGACCATAAAAGGGAAAGATAC bdnf  
 CTGTCGTTGTCGCTTGTGAGAAAATCGGAAAGAACATGA nglf-3  
 CTGTCGTTGTCGCTCAGCAGGAAGGCTGTGAGAAGACCCCTGA nglf

【図8】

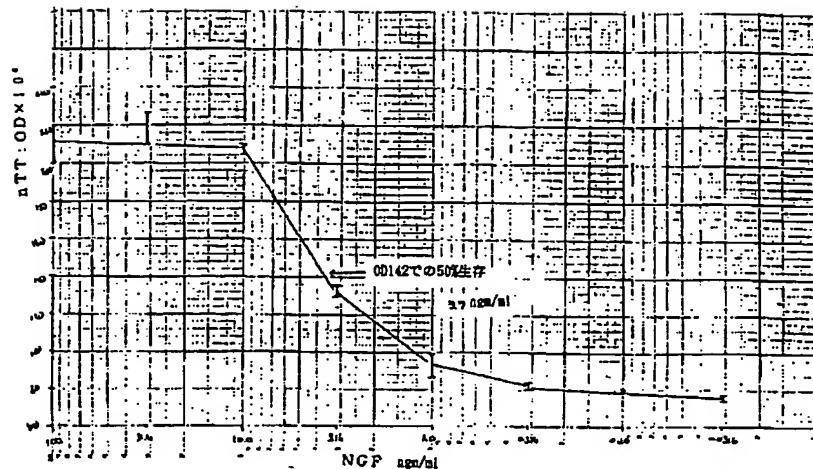


[図7]

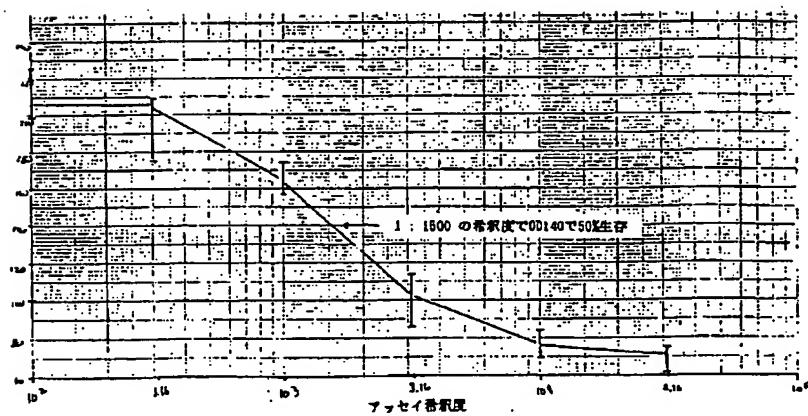
## ヒトNNGFおよびBDNFと比較したヒトNNGF-3のアミノ酸配列

bndf	M T I L P L T M V I S Y F G C M K A A P M K E A N I R G Q G - - G L
ngf-3	M S I L P V I F L A Y L R G I Q G N N D Q R S L P E D S L N S L
ngf	M S M L P F Y T L I T A F L I G I Q A E P H S E S N V P A - G - H - -
A Y P G V R - T - - H G C T L E S - - Y N G C P K A G S R G L T S L A D T F E H	
I I K L I Q A D I L K N K L S K Q M V D V K E N Y Q S T L P K A E A P R E P	
T I P Q V H W T K L Q H S L D - - T A - L R R A - R S A - P - A A A I A A R	
V I E E L L D E D - Q K Y R P N E E N - - N K D A D L Y T S B Y M L S S Q V	
E R G G P A K S A F Q P Y I A N D T E L L R Q Q R R Y N S P R Y L S D S T Q P	
V A G - Q T R - N T - T Y - - D P R L F - K K R R L R S P R Y L P S T Q P	
P L E P P L L F L L E E Y K N Y L D A A N M S M R V R R - - H S D P A R R B G	
P R E A D T Q D I D F E Y Q G A A P F N R T H R S K B S S H P I P H R G	
E L S Y G D S I E E M Y T A D K T A V D M S Q G T Y T V L E K V P V S K	
E Y G D S I E E M Y T A D K T A D I R G H Q Y T V L G E I K T G N	
E F G D S I E E M Y T A D K T A D I K G K E V M Y L G E V N I N N	
G Q L E Q Y P Y E T M [C] N P M G Y T A E G [C] R G I D D K R H N N Q [C] R M T Q	
E P V K Q Y P Y E T M [C] R K E A R P V D G [C] R G I D D K R H N N Q [C] R M T Q	
S V P A Q Y P Y E T M [C] R D P N P Y D G [C] R G I D D K R H N N Q [C] R M T Q	
S Y V A A L T N D S R K R I G W R P I R I D T B [C] V [C] T L T I K R G B T -	
T Y V R A L T N D G - E Q A A W R P I R I D T A [C] V [C] V L E R R A V A R A .	

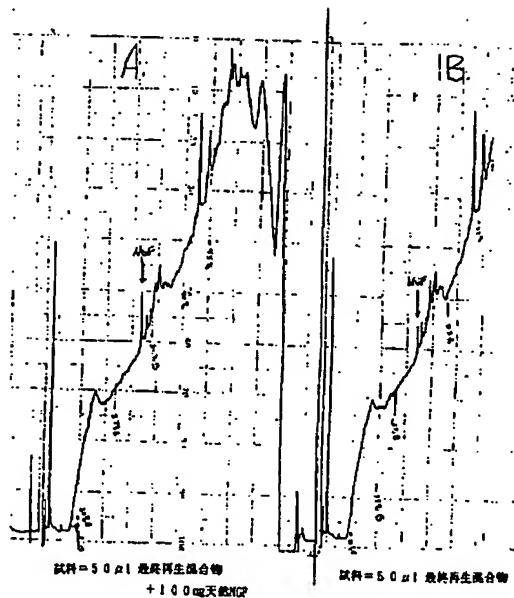
【図9】



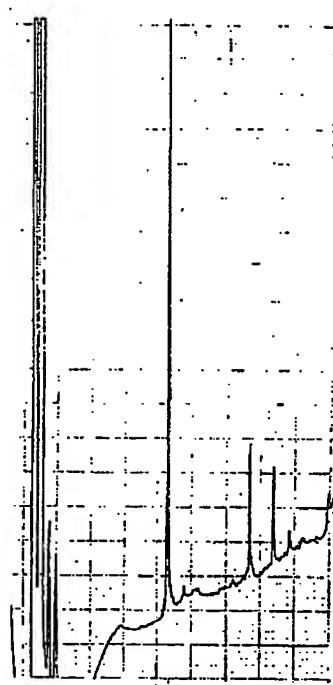
【図10】



【図11】

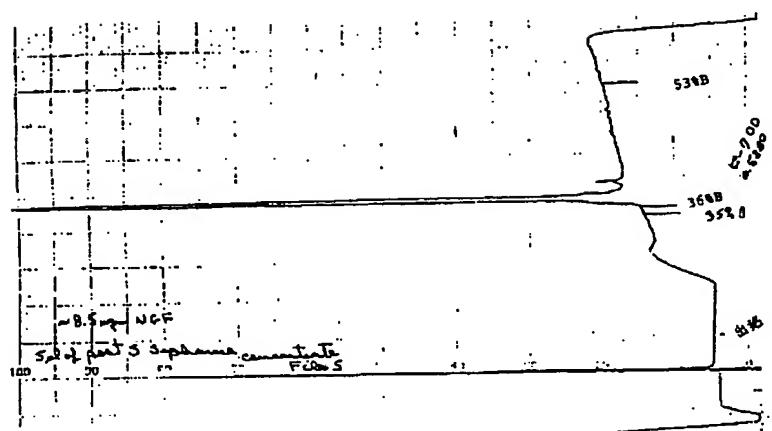


【図12】



C. 逆相:  $dry-ice$   $-20^{\circ}C$   
還元NCFが47.8で、再生NCFが37.8で溶出

【図14】



## 【手続補正書】

【提出日】平成3年6月6日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0052】ヒトゲノムDNAライブラリーからこれらの方法により単離された、ここに記載のヒトBDNFタンパク質の少なくとも一部をコードするDNA配列はプラスミドpSYN23に挿入された。このプラスミドは、ブダベスト条約に従って、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（メリーランド州ロックビル）に1991年3月20日受託番号40992号として寄託されている。このDNA配列は、223部位のアミノ酸に対応するコドンがAGAでなくAAAとなって\*

\*いる点を除き図1に記述されている。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0053】ヒトゲノムDNAライブラリーからこれらの方法により単離された、ここに記載のNGF-3タンパク質の少なくとも一部をコードするDNA配列はプラスミドpSYN30に挿入された。このプラスミドは、ブダベスト条約に従って、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（メリーランド州ロックビル）に1991年3月20日受託番号40991号として寄託されている。このDNA配列は、以下の実施例4で詳述する。

## 【手続補正書】

【提出日】平成5年7月15日

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【図2】ベクターpT5Tを用いたE. coliににおけるヒト成熟（プロセッシングを受けた）NGFの発現を示す電気泳動図の写真である。

## 【手続補正4】

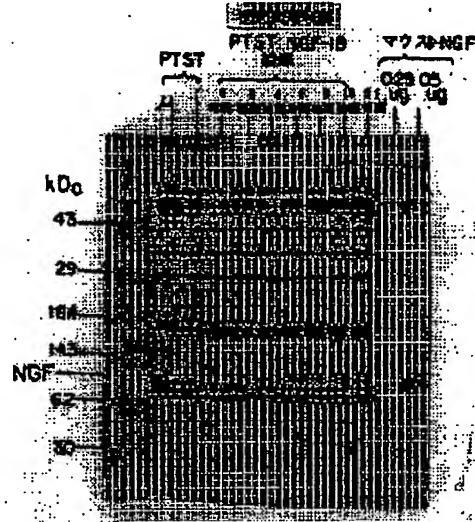
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【図2】



## 【手続補正5】

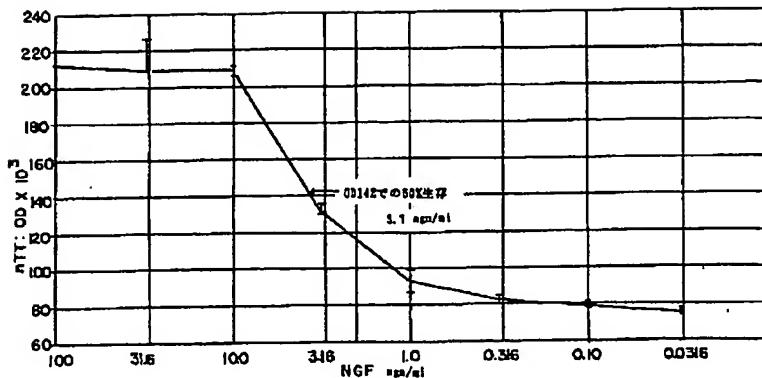
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図9

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【図9】



【手続補正6】

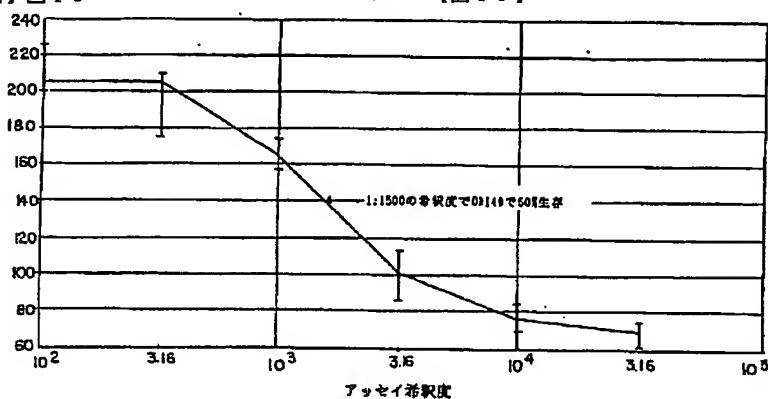
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図10

\* 【補正方法】変更

【補正内容】

\* 【図10】



【手続補正7】

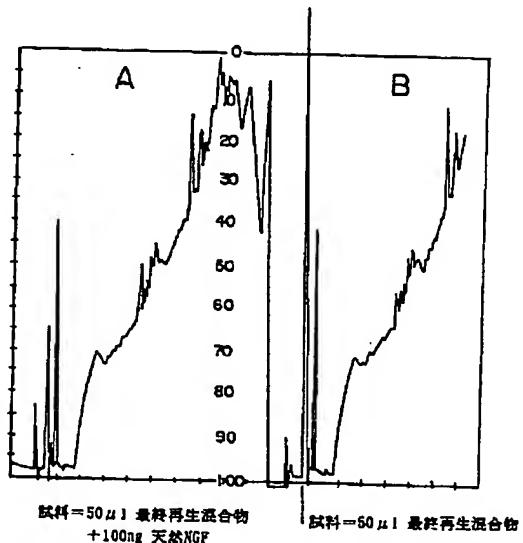
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図11

【補正方法】変更

【補正内容】

【図11】



【手続補正8】

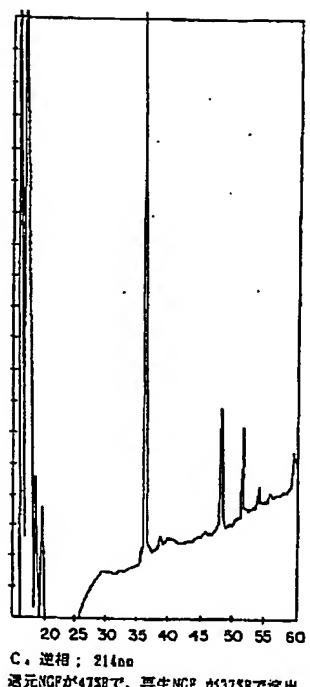
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図12

【補正方法】変更

【補正内容】

【図12】



C. 逆相: 214nm  
還元NCFが47%で、再生NCFが37%で検出

【手続補正9】

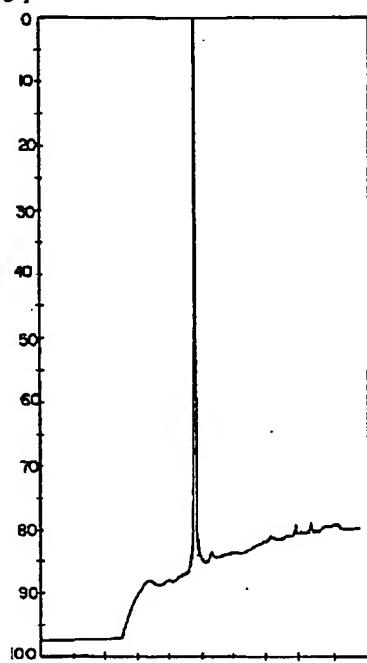
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図13

【補正方法】変更

【補正内容】

【図13】



【手続補正10】

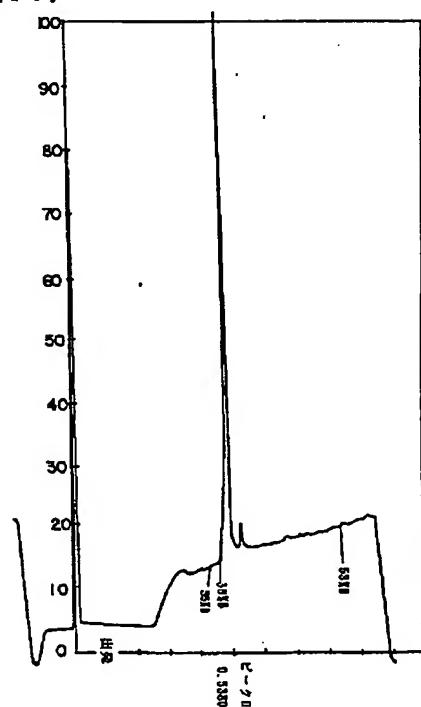
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図14

【補正方法】変更

【補正内容】

【図14】



フロントページの続き

(72)発明者 スーザン ベックテッシュ  
アメリカ合衆国 コロラド州 80302,  
ボウルダー, 34番ストリート 3344

(72)発明者 ドリツラヴ ミスマー  
アメリカ合衆国 コロラド州 80303,  
ボウルダー, ベンタヴェン 76

(72)発明者 タダヒコ コウノ  
アメリカ合衆国 コロラド州 80027,  
ルイスヴィル, ヘイズ コート 1557